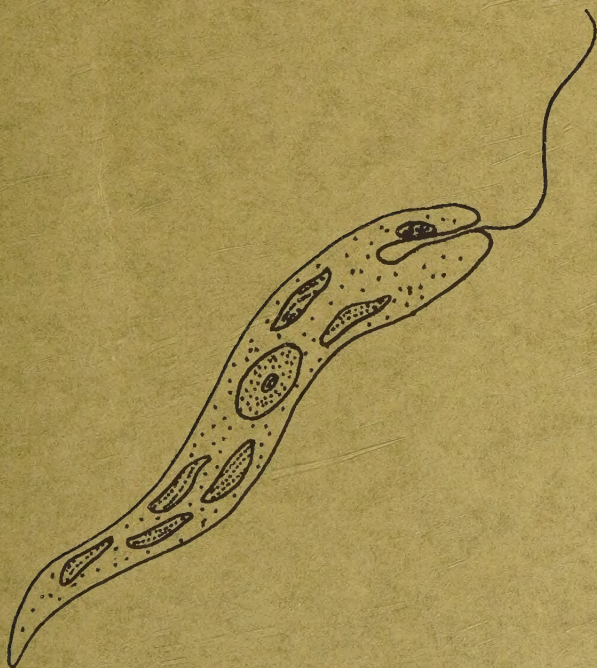


BEEINFLUSSUNG DER FETTSÄURE - UND LIPIDBILDUNG
IN EUGLA GRACILIS DURCH VERSCHIEDENE
FAKTOREN



1975

RUTH RIESSNER-SCHOELLER

Beeinflussung der Fabelwelt und
Lichtbildung in Eugène Ionesco's
durch seine Werke

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Beeinflussung der Fettsäure - und Lipidbildung in Euglena Gracilis durch verschiedene Faktoren

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ruth Riessner-Schoeller

aus Diessen am Ammersee

Juni 1975



1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Pohl
 2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wagner
- Tag der mündlichen Prüfung: 12. 11. 1975

Gewidmet meinen verständnisvollen

Eltern

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater
Professor Dr.P.Pohl , der wissenschaftliche Neu-
gierde zu wecken versteht , sowie Herrn Dr. Göbel
vom Institut für vergleichende Tropenmedizin
für seine selbstlose und gewissenhafte Mithilfe.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	Seite	1
ALLGEMEINER TEIL		5
A) <i>Euglena gracilis</i> als geeignetes Untersuchungsobjekt		5
B) Bisher bekannte Einflüsse von Faktoren auf <i>Euglena gracilis</i>		10
C) Aussuchen des am besten geeigneten Stammes von <i>Euglena gracilis</i>		13
D) Untersuchungen an <i>Euglena gracilis</i> , Stamm Z		16
I.) Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Vitamin B ₁		16
II.) Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Vitamin B ₁₂		21
III.) Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Sulfat		22
IV.) Einfluß von Licht		27
a.) Einfluß von Dunkel-Tageslichtwechsel		28
b.) Einfluß der Lichtintensität		31
V.) Einfluß der Wellenlänge des Lichtes		36
VI.) Einfluß von DCMU		48
VII.) Elektronenmikroskopische Untersuchungen		62
E) Diskussion		69
EXPERIMENTELLER TEIL		
1.) Algen		
a.) Nährmedium		79
b.) Züchtung im Tageslicht		80
c.) Züchtung im Dunkeln		80
d.) Züchtung bei verschiedenen Wellenbereichen des Lichtes		80

e.)	Lichtmessungen	81
f.)	Bestimmung des Dunkelwachstums	81
g.)	Chlorophyllbestimmung	82
2.)	Lipide	
a.)	Lipidextraktion	82
b.)	Dünnschichplatten	82
c.)	Auftragen der Gesamtlipide	83
d.)	Laufmittel	83
e.)	Nachweis der Lipide	83
f.)	Quantitative Bestimmung der Glycolipide (MGDG , DGDG , SL)	84
g.)	Gesamtphosphorbestimmung	84
3.)	Fettsäuren	
a.)	Transmethylierung	85
b.)	Gaschromatographie	88
4.)	$^{14}\text{CO}_2$ - Einbau	89
	LITERATURVERZEICHNIS	90

EINLEITUNG

Das Hauptanliegen dieser Dissertation sollte sein, einige Beiträge zur Kenntnis der Biosynthese von "essentiellen Fettsäuren" in pflanzlichen Organismen zu liefern. Essentielle Fettsäuren sind ungesättigte Fettsäuren, die nur von Pflanzen, nicht aber von Tieren synthetisiert werden können und deshalb von den tierischen Organismen mit pflanzlicher Nahrung aufgenommen werden müssen (1-3). Sie lassen sich auf Grund der Anordnung ihrer Doppelbindungen in zwei sogenannte "Fettsäure-Familien" (nach KLENK) einordnen, nämlich in die Linolsäure-Familie (z.B. $\Delta 7, 10-16:2$, $\Delta 9, 12-18:2$, $\Delta 8, 11, 14-20:3$, $\Delta 5, 8, 11, 14-20:4$ u.a.m.^x) und in die α -Linolensäure-Familie (z.B. $\Delta 7, 10, 13-16:3$, $\Delta 9, 12, 15-18:3$, $\Delta 8, 11, 14, 17-20:4$ u.a.m.). Besonders reich z.B. an Linol- und α -Linolensäure sind einige pflanzliche Samenöle (4-10). Fischöle (Lebertran) enthalten große Mengen an langkettigen und hoch-ungesättigten essentiellen Fettsäuren (11-14), wobei aber darauf hingewiesen werden muß, daß diese Verbindungen in den Fischölen und überhaupt in allen tierischen Geweben letztlich ihren Ursprung in den essentiellen Fettsäuren der pflanzlichen Nahrung (z.B. Phytoplankton) haben. Die Tiere bauen aus diesen Verbindungen durch Kettenverlängerung und Anlage weiterer Doppelverbindungen ihre eigenen Fettsäuren auf(15).

Bei Untersuchungen über essentielle Fettsäuren aus Pflanzen muß beachtet werden, daß sich ganz generell die verschiedenen Gruppen des Pflanzenreiches hinsichtlich ihrer Fettsäuren stark voneinander unterscheiden: Die Bacteriophyceae (16-40) bilden geradkettige und verzweigte gesättigte Fettsäuren mit vor allem 12-18 C-Atomen sowie Monoen-Fettsäuren (z.B. $\Delta 7-14:1$, $\Delta 9-16:1$ und $\Delta 11-18:1$). Die Biosynthese dieser Verbindungen erfolgt zumeist anaerob, bei den höher entwickelten Formen jedoch auch schon aerob unter Verwendung von molekularem Sauerstoff.

Bei allen in der Evolution nachfolgenden höheren Organismen überwiegt dann die aerobe Fettsäurebiosynthese, die anscheinend die Bildung der höher-ungesättigten Fettsäuren ermöglicht. So finden sich bei verschiedenen Pilzen und Hefen (41-47) bereits Linolsäure ($\Delta 9,12-18:2$) und α -Linolensäure ($\Delta 9,12,15-18:3$). Die verschiedenen Familien der Algen (Euglenophyceae, Chlorophyceae, Rhodophyceae, Phaeophyceae etc.) zeichnen sich durch eine deutliche Weiterentwicklung der Fettsäure-Biosynthese aus: Diese Organismen bilden neben gesättigten Fettsäuren in größeren Mengen vor allem ungesättigte C_{16} -bis C_{22} -Fettsäuren mit bis zu 6 Doppelbindungen (1,48,49,51). Bei den Chlorophyceae und Euglenophyceae findet sich überhaupt die größte Vielfalt an ungesättigten Fettsäuren im ganzen Pflanzenreich (19,50 - 57).

Im Gegensatz zu den oben erwähnten und im Wasser lebenden Algen weisen die unter völlig anders gearteten ökologischen Bedingung lebenden Landpflanzen eine völlige Verschiebung hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren auf: Bei diesen Pflanzen findet man neben gesättigten Fettsäuren (vor allem $12:0-18:0$) fast nur noch die Palmitoleinsäure ($\Delta 9-16:1$), Ölsäure ($\Delta 9-18:1$), Linolsäure ($\Delta 9,12-18:2$) sowie α -Linolensäure ($\Delta 9,12,15-18:3$). Die Biosynthese der höher ungesättigten C_{18} -Fettsäuren (18:4) und C_{20} - bis C_{22} -Fettsäuren wurde also im Verlauf oder Gefolge des evolutionären Überganges von den Wasser- zu den Landpflanzen fast vollständig aufgegeben (2,3)). Die höchst-ungesättigte Fettsäure aller Landpflanzen ist, abgesehen von wenigen Ausnahmen (58-66), die α -Linolensäure.

Bisherige Untersuchungen an Algen (47,48,52,57,67-70) zeigten, daß zumindest in diesen Organismen die Biosynthese der ungesättigten Fettsäuren von bestimmten Umweltfaktoren abhängt, wie z. B. vom Tageslicht und seiner Intensität, sowie vom Stickstoff-Gehalt des Mediums.

Aus diesen Arbeiten ging hervor, daß gerade die Bildung der essentiellen Fettsäuren besonders stark von den obigen Faktoren beeinflusst wird.

x)

Zur Schreibweise: Eine $\Delta 7,10-16:2$ -Fettsäure bedeutet eine ungesättigte Fettsäure mit 16 C-Atomen und 2 Doppelbindungen zwischen den C- Atomen 7/8 bzw. 10/11).

Aufgabenstellung:

Aufgabe dieser Dissertation sollte aus den oben genannten Gründen sein, nach weiteren Faktoren zu suchen, die die Biosynthese der Fettsäuren in einem geeigneten pflanzlichen Organismus (*Euglena gracilis*)beeinflussen. Weiterhin sollten auch die Lipide in die Untersuchungen miteinbezogen werden, weil aus den vorangegangenen Arbeiten (57,71,72) hervorgegangen war, daß die einzelnen Lipide bei verschiedenen Pflanzen unterschiedliche und für die betreffenden Lipide charakteristische Fettsäure-Zusammensetzungen haben, was auf Zusammenhänge zwischen der Fettsäure- und Lipid-Biosynthese hindeutet.

Die Gründe, warum in dieser Dissertation gerade die in den Kapiteln D (I - VII) aufgeführten Faktoren auf ihre Einflüsse untersucht wurden, sind folgende:

Einfluß von Vitamin B1 und B 12:

Untersuchungen von POHL und Mitarbeitern (70) hatten ergeben, daß bei Züchtung von Algenkulturen unter Zusatz von Hefe-Extrakt der Anteil der ungesättigten Fettsäuren an den Gesamt-Fettsäuren stark anstieg. Als ein verantwortlicher Faktor wurde der hohe Stickstoffgehalt (ca. 10 %) des Hefe-Extraktes ermittelt. Möglicherweise war dieser nicht der einzige im Hefe-Extrakt enthaltene Faktor. Da bekannt ist, daß *Euglena gracilis* die Vitamine B1 und B12 zum Leben benötigt (73,74) wurden diese beiden Vitamine auf ihren Einfluß untersucht.

Einfluß von Sulfid:

Da der Lipid, der sich als stark abhängig von Licht und vom H-Gehalt der Nährlösung erwiesen hatte, ist das Sulfolipid, welches als Charakteristikum die Sulfochinone enthält, eine. Reihe mit einer SO_2H -Gruppe. Der Organismus *Gracilaria* der Pflanzen Sulfid, die allein mit Sulfid als Sulfid-Lieferant vorwurden, vollständig ein-
fließen unter der Wirkung von Sulfid-Lieferanten und e-
ganz anders.

Einfluß des Lichtes auf die Wellenlänge des Lichts

Die Untersuchungen über den Einfluß der Wellenlänge des Lichts ergaben sich aus der Kenntnis des von verschiedenen Autoren beschriebenen Einflusses des Tageslichts (57, 67-69), wobei die Arbeiten über den Einfluß von Licht und Dunkel (Kapitel D/IV) als Voraussetzung und Grundlage für die Wellenlängen-Versuche notwendig waren.

Einfluß von DCMU und Elektronenmikroskopie

Wie zu Beginn der Kapitel D/VI und D VII beschrieben wird, ergaben sich diese Arbeiten aus den Ergebnissen der vorangegangenen Kapitel (D/IV und D / V).

ALLGEMEINER TEIL

A) *Euglena gracilis* als geeignetes Untersuchungsobjekt

Für die in dieser Dissertation beschriebenen Arbeiten wurde *Euglena gracilis* (Euglenophyceae) als Untersuchungsobjekt ausgewählt, weil diese einzellige Alge gegenüber anderen pflanzlichen Organismen zwei wichtige Vorteile hat:

1) *Euglena gracilis* läßt sich sowohl im Dunkeln als auch im Licht züchten und bot damit die Voraussetzung für Untersuchungen über den Einfluß von Licht bzw. der Wellenlänge des Lichts auf die Fettsäure- und Lipidbiosynthese.

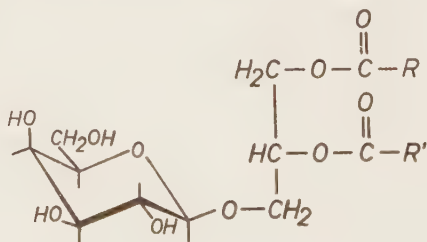
2) *Euglena gracilis* zeichnet sich gegenüber den meisten anderen pflanzlichen Organismen durch eine außerordentliche Vielfalt an Fettsäuren und Lipiden aus, wie es für die hier geplanten Arbeiten erwünscht war.

Zu 1): *Euglena gracilis* wächst im Dunkeln heterotroph und farblos und benötigt eine organische Kohlenstoffquelle wie z. B. Acetat, Butyrat, Citrat, Lactat, Glucose u. ä. (73,74,82). Jede Zelle bildet bei Dunkelwachstum etwa 30 farblose Proplastiden aus. Bei Belichtung bilden sich pro Zelle etwa 10-12 Chloroplasten, die 10-14 Lamellen mit je 3 Thylakoiden enthalten (73,74,82,83,85). An der Chlorophyllbildung ist das Phytochrom-System nicht beteiligt (75). Beiderseits der Chloroplasten wird im Licht als Reservestoff Paramylum (Euglenenstärke) in konzentrischen Schichten (84) abgelagert. Außerdem bildet *Euglena* bei Belichtung einen carotinoid-haltigen "Augenfleck" und eine bewegliche Geißel. Sowohl für das Dunkel- als auch für das Lichtwachstum sind die Vitamine B1 und B12 erforderlich. (73,74)

Zu 2): Nach den Untersuchungen verschiedener Autoren (44,45, 47,57,67,69,71,72,77-80) bildet *Euglena gracilis* bei Dunkelwachstum vor allem Phospholipide (Phosphatidylcholin, Phosphatidyläthanolamin, Cardiolipin), Neutral-Lipide (Wachsester,-

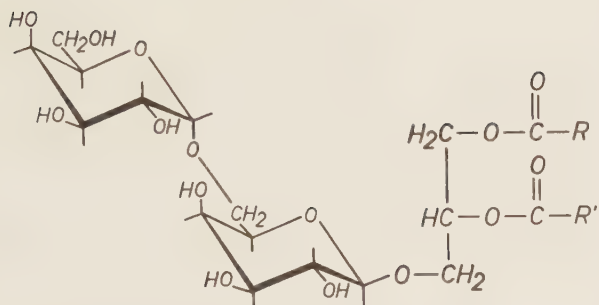
Triglyceride) sowie überwiegend gesättigte und einfach-
 ungesättigte Fettsäuren (12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 16:1
 und 18:1) und längerkettige Polyenfettsäuren (18:4,20:4,
 20:5, 22 :6). Bei Züchtung im Licht werden darüberhinaus
 in großen Mengen noch Glycolipide (Monogalactosyldigly-
 cerid, Digalactosyldiglycerid und Sulfolipid), Phosphati-
 dylglycerin und höher ungesättigte C₁₆ und C₁₈-Fettsäuren
 (16:2, 16:3, 16:4, 18:2 und 18:3) synthetisiert. Vor allem
 die 16:4 - Fettsäure(4,7,10,13) wird nur von sehr weni-
 gen Pflanzen gebildet (49, 70). Eine ähnliche Vielfalt
 hinsichtlich der Lipide und Fettsäuren findet sich sonst
 nur bei marinen makroskopischen Grünalgen (1,15,49,52,56).
 Einzellige Süßwassergrünalgen bilden zwar die gleichen
 Phospho- und Glycolipide wie *Euglena gracilis*, jedoch ab-
 gesehen von wenigen Ausnahmen (49, 70) nicht die 16:4-
 Fettsäure sowie die höher-ungesättigten C₁₈- bis C₂₂-
 Fettsäuren (18:4, 20:4, 20:5, 22:6). Sie lassen sich
 überdies in der Regel nicht wie *Euglena gracilis* im
 Dunkeln züchten, Eine Ausnahme bilden hier farblose Algen
 der Chlorophyceae, die aber wiederum bei Belichtung keine
 Chlorophylle und Glycolipide bilden (81).

Nachfolgend sind die oben erwähnten Phospho- und Glyco-
 lipide von *Euglena gracilis* mit ihren Strukturformen auf-
 geführt.



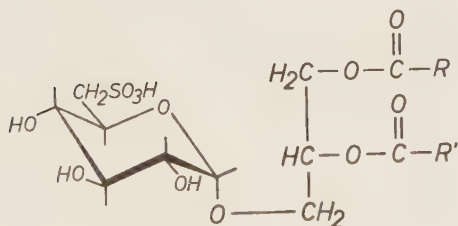
Monogalactosyldiglycerid (MGDG)

O-β-D-Galactopyranosyl-(1→1')-2',3'-di-O-acyl-D-
 -glyceridβ-D-Galactosyldiglycerid



Digalactosyldiglycerid (DGDG)

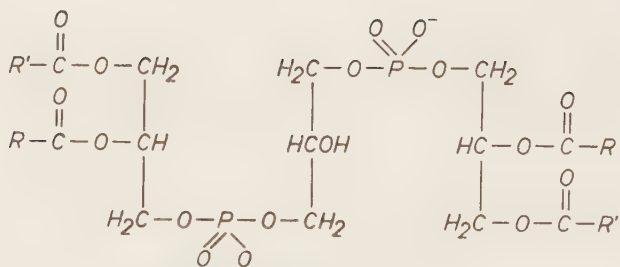
O- $[\alpha$ -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1')] -2',3'-di-O-acyl-D-glycerid; α -D-Galactosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-Galactosyldiglycerid



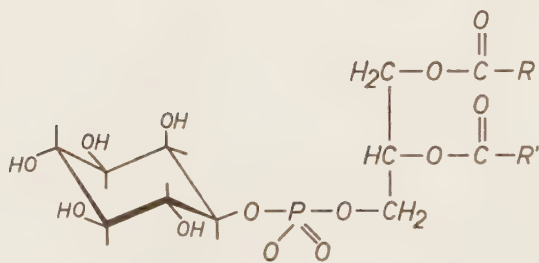
Sulfolipid (SL)

Sulfoquinovosyldiglycerid

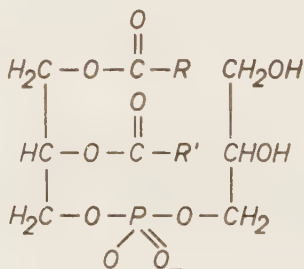
O-[6-Sulfo-6-desoxy- α -D-Glucopyranosyl]-(1 $\rightarrow$ 1')-2',3'-di-O-acyl-D-Glycerid;



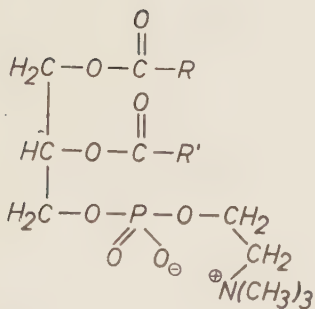
Cardiolipid (C)
Diphosphatidylglycerid



Phosphatidylinositol (PI)
Monophosphoinosit

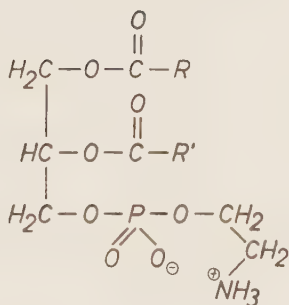


Phosphatidylglycerid
(PG)



Phosphatidylcholin (PC)

Phosphatidylaethanolamin
(PE)



B) Bisher bekannte Einflüsse von Faktoren auf
Euglena gracilis

Aus den bisher veröffentlichten Arbeiten über *Euglena gracilis* geht hervor, daß dieser Organismus gegen eine Reihe von physikalischen Einflüssen und gegen bestimmte chemische Verbindungen empfindlich ist, und zwar vor allem hinsichtlich seiner Chlorophyll- und Chloroplastenbildung. Häufig verliert nämlich *Euglena* unter dem Einfluß solcher Faktoren z. T. reversibel, z. T. irreversibel die Fähigkeit, zu ergrünen; die Zellen bleichen aus ("Bleaching").

Unter den physikalischen Einflüssen sind vor allen die Temperatur und UV-Licht zu nennen. So kommt es durch Züchtung bei erhöhter Temperatur (höher als 32°) und bei gleichzeitiger Belichtung zum Bleaching (107-109). Besonders wirksam erwiesen sich unter den obigen Bedingungen Rot- und Blaulicht, nicht hingegen Grünlicht (109). UV-Licht verhindert bei *Euglena gracilis* den Einbau von PO_4 in die DNS (114) und bewirkt, daß sich die Zellen zusammenkugeln und ihre Geißeln(73) sowie die Fähigkeit zur Replikation der Plastiden (89) verlieren. Mit der 3. Algengeneration beginnt das Bleaching, welches etwa mit der 8. Generation vollendet ist (ca. 85 Std) (90). Die durch UV gebleichten Kulturen können aber weiterhin als permanent farblose Klone gezüchtet werden (115).

An chemischen Verbindungen wurden vor allem Antibiotika und Hemmstoffe in Versuchen mit *Euglena gracilis* eingesetzt. Chloramphenicol hemmt die Bildung der Chloroplasten, Chlorophylle und Galactolipide, beeinträchtigt aber nicht die Biosynthese der Phospholipide (87). Zahlreiche Autoren haben sich mit der Wirkung von Streptomycin auf *Euglena* befaßt. Dieses Antibiotikum blockiert die licht-induzierte Bildung von Chlorophyllen

und Chloroplasten, aber nicht die Zellteilung. Der Verlust der Fähigkeit zur Chloroplastenbildung ist irreversibel (88,96-99,106,111). Bei Zugabe von Streptomycin zu lichtgezüchteten *Euglena*-Kulturen werden die Chloroplasten nach 7 Generationen kürzer. Nach 11 Generationen gleichen sie den im Dunkeln sich bildenden Proplastiden (112). Ebenso wie Streptomycin bewirken auch andere strukturell ähnlich gebaute Antibiotika wie z. B. Kanamycin, Neomycin u. a.m. sowie Erythromycine, daß *Euglena* ausbleicht (86).

Das Breitband-Antibiotikum Myxin verhindert die Bildung von Chlorophyllen und Proplastiden sowie die Replikation der Chloroplasten in Konzentrationen, die keinen Einfluß auf das Wachstum und Weiterleben der Zellen haben (116).

Cycloheximid (Actidion) blockiert die Chlorophyll-Biosynthese von *Euglena gracilis*, vermutlich auf dem Weg über eine Blockade der Proteinsynthese (103-105).

Für Photosyntheseversuche an *Euglena gracilis* wurde von mehreren Autoren DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethyl-Harnstoff) als Photosynthesehemmstoff eingesetzt (100, 102,110,84,113). DCMU ist ein Inhibitor des Elektronenflusses von Photosystem II zum Photosystem I und verhindert dadurch die photosynthetische Sauerstoff-Entwicklung (102). Unter dem Einfluß dieser Verbindung sinkt bei *Euglena gracilis* die Zahl der Chloroplasten pro Zelle ab, außerdem kommt es durch Zusammenschluß mehrerer Chloroplasten zur Bildung von "Riesenchloroplasten" (95).

Der Einfluß von Licht auf *Euglena gracilis* ist bereits im vorhergehenden Kapitel A beschrieben worden. Bei Erhöhung der Licht-Intensität steigt die Zahl der Chloroplasten (83) und der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren (47).

Nach den Untersuchungen von POHLE (57,71,72) hat der Stickstoffgehalt der Nährlösung (in Form von NH_4^+) einen erheblichen Einfluß auf die Bildung von Chlorophyllen, Fettsäuren und Lipiden in *Euglena gracilis*. Bei hohen N-Konzentrationen (höher als etwa $400 \mu\text{Mol N/l}$) wächst dieser Organismus unter stärkerer Chlorophyllbildung und synthetisiert überwiegend höher-ungesättigte C_{16} und C_{18} -Fettsäuren und Glycolipide (MGDG und DGDG). Bei niedrigen N-Konzentrationen werden dagegen nur geringe Chlorophyllmengen, gesättigte Fettsäuren (14:0 - 16:0), Phospholipide und Wachsester gebildet.

C) Ausuchen des am besten geeigneten Stammes von
Euglena gracilis

In den nachfolgend beschriebenen Voruntersuchungen sollte zunächst der am besten geeignete Stamm von *Euglena gracilis* bestimmt werden. Als Auswahlkriterien sollten gelten:

- a) das Wachstum im Dunkeln und im Tageslicht
- b) die Menge der gebildeten Gesamtlipide
- c) die qualitative Zusammensetzung der Fettsäuren.

Die folgenden 6 Stämme von *Euglena gracilis* wurden vom Pflanzenphysiologischen Institut (34 Göttingen, Nikolausberger Weg 18) bezogen und nach den obigen Kriterien untersucht:

- 1.) *Euglena gracilis* Klebs, leg. S.P. Chu,
- 2.) " " " , leg. Sister Monica Taylor,
- 3.) " " " , var. *Saccharophila*,
- 4.) " " " , leg. T.G. Tomlinson,
- 5.) " " " , leg. De Saedeler.

Tab.: 1 Trockengewichte und Gesamtlipide der untersuchten Stämme von *Euglena gracilis*

Stamm	Trockengewichte (mg)		Gesamtlipide (mg)	
	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht
K	123,7	125,0	4,3	11,0
K	142,4	154,4	6,0	21,0
R	91,4	98,7	7,5	19,3
T	68,2	78,1	7,3	16,2
W	226,0	112,2	23,4	41,9
Z	149,5	305,4	11,4	32,7

Tab. 2: Fettsäurezusammensetzung der untersuchten Stämme von *Euglena gracilis*

Stamm	K	M	R	T	W	Z
Fettsäuren (% S.Gesamt- fett- säuren)						
14:0	5,2	8,0	8,2	3,3	6,2	7,7
14:1	Sp	Sp	0,3	0,5	0,1	Sp
16:0	18,4	19,8	12,8	4,5	18,4	11,4
16:1	4,8	7,6	11,7	9,2	6,4	9,2
16:2	9,4	10,6	14,3	14,2	11,2	11,2
16:3	10,6	3,7	1,7	1,8	7,3	4,0
16:4	4,8	6,4	9,0	12,5	8,4	11,7
18:0						
18:1	9,0	10,2	3,7	4,4	9,0	2,0
18:2	17,2	15,3	13,7	14,2	12,8	17,1
18:3	12,3	7,5	11,9	15,4	7,4	15,8
18:4	0,6	0,2	0,9	0,6	0,3	1,3
20:0	3,1	4,8	4,4	2,6	7,4	Sp
20:4	2,7	2,8	5,7	4,6	2,5	4,9
20:5	1,6	2,4	1,4	2,2	2,4	2,9

Tabelle 2 zeigt, daß sich die 6 *Euglena*-Stämme hinsichtlich ihrer Fettsäurezusammensetzungen nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Deshalb waren für eine Auswahl die Daten in Tab. 1 entscheidend: Auf Grund dieser Werte erschienen zwei *Euglena*-Stämme (W und Z) besonders geeignet, weil sie hohe Ausbeuten an Trockengewicht und an Gesamtlipiden erbrachten.

Von diesen zwei Stämmen wurde schließlich Stamm Z als am besten für die weiteren Arbeiten geeignet ausgewählt. Die Kulturen dieses Stammes ließen sich nämlich insofern am besten züchten, als die ohne "Verklumpen" wuchsen, nicht an der Gefäßwand hafteten und auf diese Weise die "gleichmäßigste" Algensuspension ergaben.

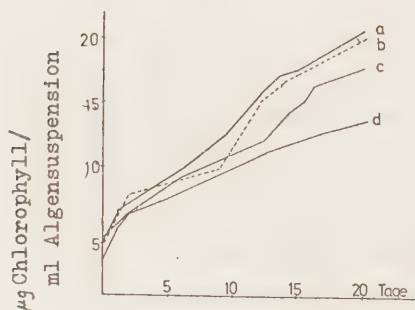
D) Untersuchungen an *Euglena gracilis*, Stamm Z

I) Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Vitamin B 1
(Thiamin) auf Wachstum, Lipid- und Fettsäurebildung.

T.E. ROUND (117) gibt als Mindestbedarf für *Euglena* einen Gehalt von 0,2 - 7 mg Thiamin pro Liter Nährlösung an. M. CRAMER u. J. MYERS (82) beschreiben ähnliche Mengen.

Zur genauen Untersuchung eines eventuellen Einflusses von Vitamin B1 wurde *Euglena gracilis* in 4 Kulturen von je 500 ml unter Zusatz unterschiedlicher Mengen an Vitamin B1 gezüchtet. Der Gehalt der Nährlösung an Vitamin B1 betrug 0,05; 0,5 und 5,0 mg Vitamin B1/Liter sowie 5,0 mg Vitamin B1 + 0,05 mg Vitamin B12/Liter.

Beim Maximum des Dunkelwachstums (8 Tage) wurden diese Kulturen belichtet. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase im Licht (weitere 20 Tage) wurden die Algenkulturen abzentrifugiert, gefriergetrocknet, gewogen, extrahiert und wie im experimentellen Teil beschrieben für die verschiedenen Bestimmungen weiter aufgearbeitet. Abb. 1 zeigt das Wachstum (Chlorophyllbildung) der Kulturen im Tageslicht.



- a = 5 mg B1/L
- b = 5 mg B1/L
+ 0,05 mg B 12/L
- c = 0,05 mg B1/L
- d = 0,5 mg B1/L

Die quantitative Bestimmung der Chlorophylle wurde nach der Methode von ARNON (118) durchgeführt.

Als Maß für den Gehalt an Glycolipiden innerhalb der Gesamtlipide wurde die Galactose - Bestimmung nach ROUGHAN und BATT (119) verwendet. Nach dieser Methode wurden sowohl die Galactolipide (MGDG und DGDG) als auch das Sulfolipid erfaßt, das als Zucker Sulfochinovose enthält.

Die Analyse der Fettsäuren erfolgte mit Hilfe der Gaschromatographie. Als Maß für die Menge der gebildeten Fettsäuren diente die mit der Gaschromatographie erhaltene Gesamtpeakfläche. Um die Gesamtpeakflächen der einzelnen Gaschromatogramme miteinander vergleichen zu können, erfolgte die GC - Analyse der Fettsäuren jeweils aus aliquoten Lipidmengen.

Tab. 3: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Vitamin B1 auf Trockengewichte, Gesamtlipide, Chlorophylle, Galactose und den Phosphorgehalt.

Gehalt an Vitamin B1 in der Nährlösung(mg)	0,05	0,5	5,0	5,0mgB1 + 0,05 mg B 12
Trockengewicht (mg)	149,0	112,0	132,0	113,0
Gesamtlipide (mg)	39,6	29,9	34,0	33,5
Gesamtlipide (% d.Trockengewichtes)	26,6	26,7	25,7	30,0
Chlorophylle (µg/mg Gesamtlipide)	226,0	230,0	254,0	295,0
Galactosegehalt der Gesamtlipide MGDG	20,0	40,9	31,0	17,0
(µg/mg Gesamt- lipide) DGDG	18,0	19,0	33,0	14,0
SL	15,5	24,0	10,8	7,0
Gesamtphosphor (µg/mg Gesamtlipide)	3,4	2,8	1,9	1,4

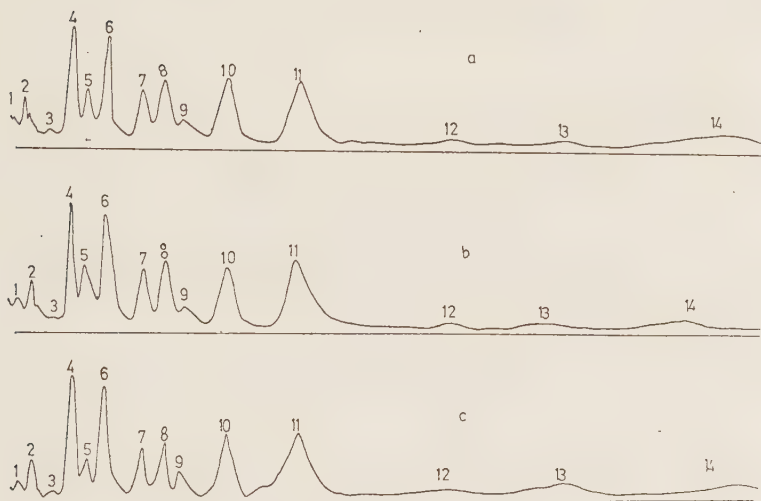
Wie aus Abb. 1 und Tab. 3 zu ersehen ist, wurde durch die hier eingesetzten Mengen an Vitamin B1 (0,05; 0,5; 5,0 mg/l) das Wachstum von *Euglena gracilis* nicht wesentlich beeinflusst. Die Zellen zeigten bei allen B1-Konzentrationen gutes Wachstum (Abb.1). Bezogen auf die Trockengewichte stiegen die Gehalte an Gesamtlipiden und Chlorophyllen bei höheren B1-Konzentrationen leicht an. Bei den Galactosewerten war keine deutliche Veränderung wahrnehmbar, während die Phosphorwerte sogar absanken. Letzteres könnte auf eine verminderte Bildung von Phospholipiden hindeuten.

Tab. 4: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Vitamin B 1 auf die Biosynthese von Fettsäuren im Tageslicht. (Prozentaler Anteil an den Gesamtfettsäuren.)

Vitamin B1 (mg/l)			Vitamin B1 (mg/l)		
0,05			0,05		
5,0			5,0		
Fettsäuren			Fettsäuren		
12:0	1,2	1,3	16:4	9,2	10,2
14:0	1,8	1,6	18:0	0,3	0,3
14:1	1,3	2,2	18:1	5,1	5,4
15:0	0,3	0,1	18:2	13,1	14,0
16:0	11,8	10,1	18:3	22,6	21,0
16:1	5,8	8,9	18:4	0,9	1,3
16:2	12,8	12,1	20:4	2,1	1,3
16:3	6,8	8,7	20:5	4,3	2,2

Abb. 2: Gaschromatographie der Fettsäuremethylester.
(GC - Säule : Reoplex)

Züchtung bei verschiedenen Vitamin B1-Konzentrationen.



a) 5,0 mg Vitamin B1

b) 0,5 mg Vitamin B 1

c) 0,05 mg Vitamin B 1

1 = 12 : 0

2 = 14 : 0

3 = 15 : 0

4 = 16 : 0

5 = 16 : 1

6 = 16 : 2

7 = 16 : 3

8 = 16 : 4

18 : 0

9 = 18 : 1

10 = 18 : 2

11 = 18 : 3

12 = 18 : 4

13 = 20 : 4

14 = 20 : 5

Bei den Fettsäuren (siehe Tab. 4) ergaben sich bei Züchtung unter verschiedenen Vitamin B₁ - Konzentrationen keine deutlichen Unterschiede. *Euglena* bildete bei niedrigem (0,05 mg/l) und hohem (5,0 mg/l) Vitamin B₁-Gehalt überwiegend ungesättigte C₁₆ und C₁₈-Fettsäuren.

Mindestbedarf an Vitamin B₁:

Der Mindestbedarf an Vitamin B₁ lag zwischen 0,01 und 0,05 mg/l, wie aus folgenden Versuchen hervorging:

2 Kulturen von *Euglena gracilis* wurden bei einem stark vermindertem Vitamin B₁-Gehalt des Nährmediums (0,01mg B₁/l) 10 Tage (Serie I) bzw. 20 Tage (Serie II) im Dunkeln gezüchtet.

Serie I zeigte bei anschließender Belichtung Wachstum unter Chlorophyllbildung.

Serie II zeigte im Licht keine Chlorophyllbildung mehr. Mit dieser Konzentration (0,01 mg Vitamin B₁/l) scheint also die Mindestmenge unterschritten zu sein.

Demnach benötigt *Euglena* also Vitamin B₁ zum Wachstum, jedoch scheinen verschieden hohe Konzentrationen dieses Vitamins keinen Einfluß auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Lipide und Fettsäuren auszuüben. Auch die Chlorophyllbildung wird nicht wesentlich beeinflußt.

II.) Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Vitamin B12 (Cobalamin) auf Wachstum, Lipid- und Fettsäurebildung.

Der Bedarf an Vitamin B12 ist lt. Literatur bei den einzelnen Euglena-Arten unterschiedlich. Nach E.F. CARELL (120), M.R.DROOP (121) und J.R. COOK (122) beträgt der Mindestbedarf an Vitamin B12 für *Euglena gracilis* etwa 0,005 - 0,03 $\mu\text{g/l}$.

Euglena gracilis wurde zur Untersuchung eines eventuellen Einflusses von Vitamin B12 in Kulturen von je 100 ml unter Zusatz unterschiedlicher Mengen an Vitamin B12 gezüchtet. Der Vitamin B12-Gehalt der Nährlösung betrug 0,02; 0,05; 0,2 und 0,5 $\mu\text{g/l}$.

Tab. 5: Einfluß von Vitamin B12 auf das Wachstum
(Chlorophyllbildung)

Vitamin B 12 ($\mu\text{g/l}$)	0,02	0,05	0,2	0,5
Chlorophylle ($\mu\text{g/mg}$ Gesamt- lipide)	55,3	57,8	59,8	61,2

Die Zellen wurden zuerst 12 Tage im Dunkeln gezüchtet. Während dieser Zeit wurden täglich Dichte-Messungen durchgeführt. Sie ergaben für alle vier Kulturen gleich hohe Wachstumswerte. Auch nach anschließender 10-tägiger Züchtung der Algen im Tageslicht zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im Wachstum. Da auch die DC der Gesamtlipide Übereinstimmung brachte, wurde auf die GC der Fettsäuren verzichtet, da auf Grund der bisherigen Erfahrungen hier ebenfalls keine Unterschiede zu erwarten waren.

Darnach scheinen die von uns gewählten (geringen) Konzentrationen an Vitamin B12 die Bildung der obigen Verbindungen und das Zellwachstum nicht unterschiedlich zu beeinflussen.

III.) Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Sulfat auf Wachstum, Lipid- und Fettsäurebildung.

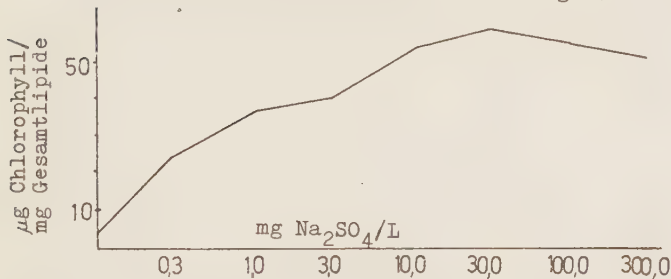
Nach D.E. BUETOW (123) und J.R. COOK (122) beträgt der Mindestbedarf an Sulfatschwefel etwa 10 mg/Liter Nährmedium (entsprechend $33,5 \text{ mg Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O} / \text{L}$). Buetow beobachtete, daß bei sehr geringem Angebot an Sulfat ($0,02 \text{ mg Sulfatschwefel} / \text{L} = 0,067 \text{ mg Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O} / \text{L}$) *Euglena* nur noch so lange lebensfähig ist, als sie noch Sulfat im Nährmedium antrifft. Ist dieses verbraucht, löst sich der Organismus innerhalb von 24 Stunden auf.

Um zu untersuchen, ob Sulfat in unterschiedlichen Konzentrationen einen Einfluß auf *Euglena gracilis* hat, wurde das Nährmedium modifiziert. Die Metallsulfate wurden durch Metallchloride ersetzt und die Nährlösung mit den folgenden Mengen an $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ versetzt:

0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0 und 300,0 mg $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O} / \text{L}$

8 Kulturen zu je 500 ml wurden 10 Tage im Dunkeln und nach Erreichen der stationären Wachstumsphase für weitere 12 Tage im Tageslicht gezogen.

Abb. 3: Wachstum (Chlorophyllbildung) bei unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen. Die Kurvenpunkte zeigen die Chlorophyllbildung von 8 Euglenakulturen beim Erreichen der stationären Wachstumsphase im Tageslicht nach 6 Tagen.



Tab. 6: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Sulfat auf die Bildung der Gesamtlipide, Chlorophylle, Galactose und auf den Phosphorgehalt.

Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O (mg/l)	0,1	0,3	1,0	3,0	10,0	30,0	100,0	300,0
Trockengewichte (mg)	14,7	20,6	21,1	26,9	32,5	31,8	39,7	40,1
Gesamtlipide (mg)	15,0	20,6	21,1	26,9	42,5	31,8	39,7	41,2
Chlorophylle (µg/mg Gesamtlipide)	4,6	24,4	37,2	40,5	54,4	59,7	55,3	56,4
Galactosegehalt d. MGDG	>0	0,6	2,5	8,0	13,0	14,5	22,7	32,0
Gesamtlipide DGDG	>0	2,3	2,0	>0	18,0	33,0	22,0	42,5
Gesamtlipide SL	>0	1,2	1,5	9,0	10,0	11,5	18,2	12,4
Gesamtphosphor (µg/mg Gesamtlipide)	>0	3,2	4,7	4,4	2,9	2,5	2,8	3,6

Die stationäre Wachstumsphase im Tageslicht wurde bei allen 8 Kulturen etwa gleichzeitig (nach 6 Tagen) erreicht.

Wie aus Tab. 6 und Abb. 3 hervorgeht, wurden die höchsten Chlorophyllwerte zu diesem Zeitpunkt bei einem Sulfatgehalt von etwa 10 - 30 mg $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}/\text{L}$ erreicht. Noch höhere Sulfatwerte brachten keine weitere Steigerung der Chlorophyllbildung mehr.

Der Gehalt an Gesamtlipiden stieg ebenfalls mit zunehmendem Sulfatgehalt an und erreichte bei etwa 10 - 30 mg $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}/\text{L}$ einen Wert von etwa 40 mg Gesamtlipiden (pro 500 ml-Kultur). Dieser Wert stieg bei noch höheren Sulfatmengen nicht mehr wesentlich an.

Auch die Galactosewerte waren in dem obigen Bereich am höchsten, während sich bei den Phosphorgehalten keinerlei Änderungen zeigten.

Im Hinblick auf die Lipidbildung zeigen die Versuche also, daß bei steigenden Sulfat-Konzentrationen der Anteil der Glycolipide an den Gesamtlipiden stark ansteigt, während der Anteil der Phospholipide sich kaum verändert.

Tab. 7 : Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Sulfat auf die Biosynthese von Fettsäuren im Tageslicht. (Prozentualer Anteil an den Gesamtfettsäuren)

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (mg/L)	0,1	0,3	1,0	3,0	10,0	100,0
Fettsäuren						
12:0	2,6	0,9	0,8	0,4	0,6	0,5
14:0	15,9	7,2	4,6	2,8	3,9	3,8
15:0	6,1	3,3	1,4	0,6	2,8	3,3
16:0	27,3	18,6	13,9	15,2	15,5	13,5
16:1	4,2	6,5	5,2	7,9	6,4	7,0
16:2	0,8	5,8	8,4	10,6	7,9	5,7
16:3	0,4	1,5	1,9	2,7	5,3	6,3
16:4	0,9	2,6	4,3	6,9	8,5	8,1
18:0	5,9	4,0	2,7	0,8	0,6	0,6
18:1	7,3	8,6	8,1	4,5	2,8	3,2
18:2	4,9	5,9	8,7	10,9	8,5	8,1
18:3	4,2	7,0	11,2	16,4	18,2	16,2
18:4	3,8	4,8	6,1	2,6	1,2	2,4
20:4	4,7	11,7	10,4	5,3	3,9	4,2
20:5	5,8	7,3	7,8	5,8	4,3	4,6
unbekannt	5,0	3,9	4,3	3,7	8,8	12,0

Die Gaschromatographie der Fettsäuren (siehe Tab.7) zeigte bei steigenden Sulfatkonzentrationen ein deutliches Absinken der Gehalte an gesättigten Fettsäuren (12:0; 14:0; 15:0; 16:0 und 18:0) sowie an Ölsäure (18:1). Die höher-ungesättigten Fettsäuren der C₁₆- und C₁₈-Reihe (16:2; 16:3; 16:4; 18:2; 18:3) nahmen demgegenüber zu. Diese Zunahme der ungesättigten Fettsäuren bzw. die Abnahme der gesättigten Fettsäuren ging zwischen 0,1 und 3,0 mg Na₂SO₄/l in relativ großen Schritten vor sich, während die Änderung bei höheren Sulfatkonzentrationen langsamer erfolgte.

Für die Biosynthese der obigen ungesättigten C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren scheint demnach eine Mindestkonzentration von etwa 1 -3 mg Na₂SO₄/l notwendig zu sein. Bei noch höheren Sulfat-Konzentrationen werden bevorzugt mehrfach-ungesättigte C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren gebildet, während der Anteil der gesättigten und einfach-ungesättigten Fettsäuren zurückgeht.

IV.) Einfluß von Licht auf Wachstum, Lipid- und Fettsäurebildung

Der Einfluß von Licht auf das Wachstum und die Bildung von Lipiden und Fettsäuren in *Euglena gracilis* ist bekannt. Während des Dunkelwachstums bildet dieser Organismus überwiegend Neutral-Lipide (vor allem Wachsester), Phospholipide und gesättigte Fettsäuren (14:0; 15:0; 16:0; 18:0). Chlorophylle werden dann nicht oder nur in Spuren gebildet. Bei Belichtung ändern sich diese Verhältnisse: Nach etwa 3 - 5 Tagen Belichtung findet man in *Euglena gracilis* vor allem ungesättigte Fettsäuren und Glycolipide (MGDG, DGDG und SL), dagegen nur wenig Neutrallipide. (45,47,57,69,77,78,124 - 132)

Zum Verständnis und als Voraussetzung für die in den weiteren Kapiteln beschriebenen Untersuchungen war es notwendig, mit dem von uns verwendeten Stamm von *Euglena gracilis* (Z) Dunkel-Tageslichtwechsel-Versuche durchzuführen, wie sie in ähnlicher Weise bereits aus der Literatur bekannt waren (47,69,77,78). Diese Versuche werden im nachfolgenden Kapitel kurz zusammengefaßt beschrieben.

a) Einfluß von Dunkel-Tageslichtwechsel

Zwei Kulturen zu je 500 ml wurden 10 Tage im Dunkeln gezogen. Eine der Kulturen wurde abzentrifugiert, die zweite anschließend weitere 10 Tage im Tageslicht kultiviert.

Abb. 4: Wachstum im Dunkeln

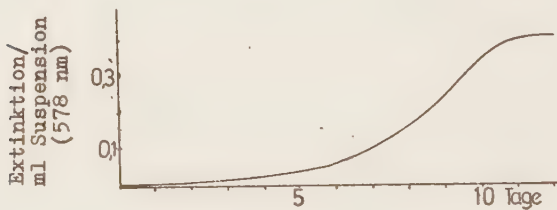
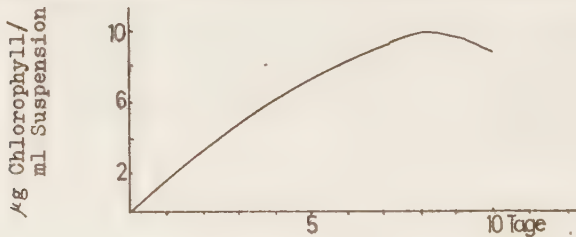


Abb.5: Wachstum (Chlorophyllbildung) im Tageslicht.



Wie Abb. 4 zeigt, erreichte *Euglena gracilis* nach etwa 12 Tagen Dunkelwachstum die stationäre Wachstumsphase. Bei anschließender Belichtung (Abb. 5) trat während der ersten Stunden eine Verzögerungsphase (lag-Phase) ein. (83,85,94, 133-136), in der sich der Stoffwechsel in der Zelle von Dunkel auf Licht umstellt. Es folgt die logarithmische Wachstumsphase bis etwa 10 Tage nach Belichtungsstart und anschließend die stationäre Wachstumsphase.

Tab. 8: Einfluß von Dunkel und Tageslicht auf die Trockengewichte, Gesamtlipide und die Chlorophyllbildung.

	Dunkel	Tageslicht
Trockengewichte (mg)	53,7	110,0
Gesamtlipide (mg)	5,8	17,4
Gesamtlipide(% d. Trockengewichtes)	10,6	15,8
Chlorophyll(μ g/mg Gesamtlipide)	--	283,0

Wie aus Tab 8 hervorgeht, verdoppelte sich das Trockengewicht im Tageslicht. Der prozentuale Lipidgehalt stieg von 10 auf etwa 15 %.

Abb.6: DC der Gesamtlipide

Einfluß von Dunkel und Tageslicht auf die Bildung der Lipide.

Dunkel	Tageslicht	
		Front
		NL
		MGDG
		C
		DGDG
		SL
		PG
		PE
		PI PC
		Start

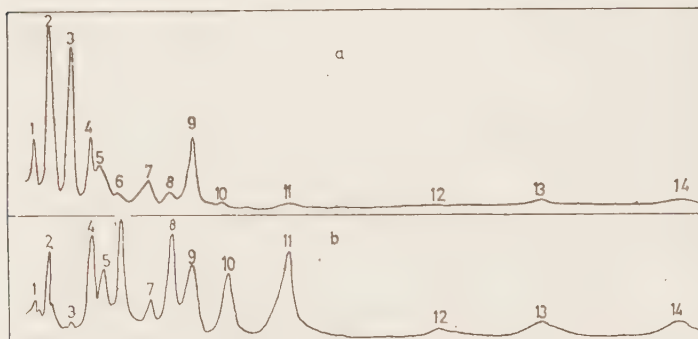
Im Dunkeln lagen vorwiegend Neutrallipide und Phospholipide vor. Im Licht überwogen Glycolipide (MGDG, DGDG und SL)

Abb.7: Gaschromatographie der Fettsäurenmethylester
(GC-Säule: Reoplex)

a) Züchtung im Dunkeln (10 Tage)

b) Züchtung im Dunkeln und anschließend 5 Tage
im Tageslicht.

1 = 12:0	5 = 16:1	9 = 18:1	13 = 20:4
2 = 14:0	6 = 16:2	10 = 18:2	14 = 20:5
3 = 15:0	7 = 16:3	11 = 18:3	
4 = 16:0	8 = 16:4	12 = 18:4	
	18:0		



Wie die Abb. 7 zeigt, überwiegen bei der im Dunkeln ge-
züchteten Euglena-Kultur (a) die gesättigten und kürzer-
kettigen Fettsäuren (12:0, 14:0, 15:0 und 16:0), während
bei anschließender Belichtung (b) vorwiegend höher-unge-
sättigte Fettsäuren der C₁₆- und C₁₈-Reihe gebildet wur-
den.

Die im Dunkeln gezüchteten Euglena-Zellen unterscheiden
sich also von den im Licht gezüchteten Zellen hinsicht-
lich ihrer Bildung von Chlorophyllen, Lipiden und Fett-
säuren.

b) Einfluss der Lichtintensität

Das Wachstum von *Euglena gracilis* hängt von der Intensität des eingestrahnten Lichts ab. Nach den Beobachtungen von CONSTANTOPOULOS und BLOCH (47) steigt bei erhöhter Lichtintensität außerdem der prozentuale Anteil der ungesättigten Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren an. Auch die Zahl der Chloroplasten pro Zelle wird gesteigert. (83)

Die nachfolgend beschriebenen Experimente sollten bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm von *Euglena gracilis* den Einfluß der Lichtintensität auf Wachstum, Lipid- und Fettsäurebildung feststellen.

2 Kulturen von je 500 ml wurden zunächst 8 Tage im Dunkeln und dann in Tageslicht bei 300 Lux und bei 800 Lux gezüchtet.

Tab. 9: Einfluss von niedriger und hoher Lichtintensität auf Wachstum, Chlorophylle, Galactolipide und Gesamtphosphor.

Lichtintensität		300 Lux	800 Lux
Trockengewicht (mg)		118,2	112,0
Gesamtlipide (mg)		13,9	29,9
Gesamtlipide (% d. Trockenge- wichtes)		11,8	26,7
Chlorophylle ($\mu\text{g}/\text{mg}$ der Gesamt- lipide)		230,0	345,0
Galactosege- halt der Ge- samtlipide ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Gesamt- lipide)	MGDG	28,0	43,0
	DGDG	39,0	42,0
	SL	18,0	24,0
Gesamtphosphor ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Gesamt- lipide)		2,3	2,8

Abb.8: Chlorophyllbildung bei hoher und niedriger Lichtintensität.

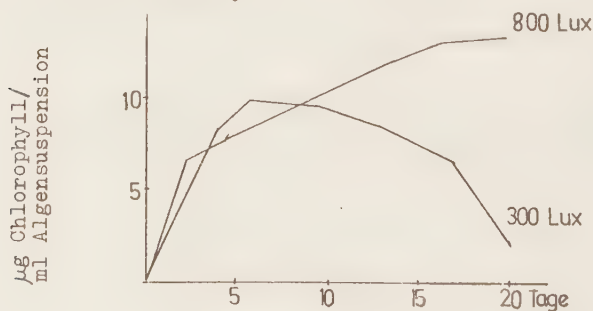


Abb. 8 zeigt, daß bei erhöhter Lichtintensität das Wachstum 20 Tage lang anstieg, während es bei niedriger Lichtintensität schon nach 6 Tagen wieder zurückging.

Innerhalb der Gesamtlipide (s.Tab. 9 und Abb.9) führte eine Steigerung der Lichtintensität zu einer erheblichen Zunahme an MGDG und zu einer leichten Zunahme der Werte für DGDG und SL. Auch der Phosphorgehalt stieg bei erhöhter Lichtintensität leicht an.

Abb.9: DC der Gesamtlipide:

Einfluß unterschiedlicher Lichtintensitäten auf die Bildung der Lipide.

300 Lux	800 Lux	Front
		NL
		MGDG
		C
		DGDG
		SL
		PG
		PE
		PI PC
		Start

Tab. 10: Einfluss unterschiedlicher Lichtintensitäten auf die Fettsäure-Bildung.

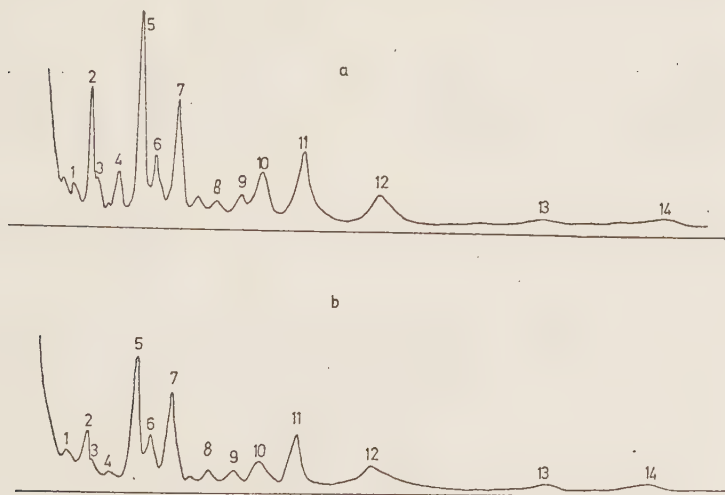
Lichtintensität	300 Lux	800 Lux
Fettsäuren (% d.Ges.F.S.)		
12:0	2,2	1,2
14:0	3,3	1,8
14:1	1,7	1,3
15:0	0,7	0,3
16:0	20,0	11,8
16:1	10,5	5,8
16:2	19,5	12,8
16:3	2,8	6,8
16:4	3,0	9,3
18:0	0,3	0,1
18:1	6,2	5,1
18:2	17,2	13,1
18:3	10,4	22,6
18:4	0,3	1,0
20:4	1,5	2,7
20:5	--	4,3

Abb. 10: Gaschromatographie der Fettsäuremethylester

a) Hohe Lichtintensität (800 Lux)

b) Niedrige Lichtintensität (300 Lux)

1 = 12:0	5 = 16:0	9 = 16:4	13 = 18:4
2 = 14:0	6 = 16:1	18:0	14 = 20:4
3 = 14:1	7 = 16:2	10 = 18:1	
4 = 15:0	8 = 16:3	11 = 18:2	
		12 = 18:3	



Auf Grund der Gaschromatographie (s.Abb. 10 und Tab.10) führte die Erhöhung der Lichtintensität von 300 auf 800 Lux zu einer Abnahme des Gehalts an gesättigten, einfach- sowie doppelt-ungesättigten Fettsäuren und zu einer Zunahme an hoch-ungesättigten Fettsäuren mit 3 und mehr Doppelbindungen. Als Folge der Erhöhung der Lichtintensität ergab sich also bei allen Kettenlängen (C_{16} bis C_{20}) eine allgemeine Tendenz zur Ausbildung von höher-ungesättigten Verbindungen.

V. Einfluss der Wellenlänge des Lichts

Die in dem vorangegangenen Kapitel (D/IV) beschriebenen Versuche hatten ergeben, daß in *Euglena gracilis* die Bildung von Chlorophyllen, Lipiden und Fettsäuren stark vom Tageslicht beeinflusst wird. Dies führte zur der Frage, ob die Biosynthese der obigen Verbindungen darüberhinaus durch bestimmte Wellenbereiche innerhalb des Gesamtspektrums des Tageslichts unterschiedlich beeinflusst werden.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, bei denen Kulturen von *Euglena gracilis* mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge belichtet wurden.

Serie I: Züchtung in 500 ml- Kulturen unter Belichtung mit Blau-, Grün-, Gelb- und Rotlicht von jeweils ca. 370 Lux (entsprechend $0,646 \text{ Watt/m}^2$; s. im experimentellen Teil).

Serie II: Wie Serie I, aber unter niedrigerer Lichtintensität von ca. 135 Lux (entsprechend $0,222 \text{ Watt/m}^2$; s. Exp. Teil).

Die Kulturen wurden jeweils 6 Tage im Dunkeln und danach 14 Tage bei Belichtung gezüchtet. Als Lichtquellen dienten die im experimentellen Teil angegebenen Leuchtstoffröhren. Zu den hier gewählten Lichtintensitäten: Diese Lichtintensitäten wurden so ausgesucht, daß *Euglena gracilis* bei der niedrigeren Intensität (ca.135 Lux) gerade noch gutes und messbares Wachstum zeigte und bei der höheren Intensität (370 Lux) zumindest im Gelb- und Rotlicht sehr gutes Wachstum hatte.

Abb. 11: Chlorophyllbildung von *Euglena gracilis* bei Belichtung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge.

a) Höhere Lichtintensität (370 Lux)

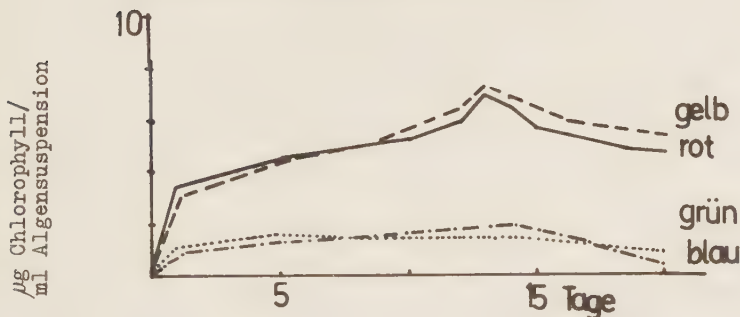


Abb. 12: Chlorophyllbildung von *Euglena gracilis* bei Belichtung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge.

b) Niedrigere Lichtintensität (135 Lux)

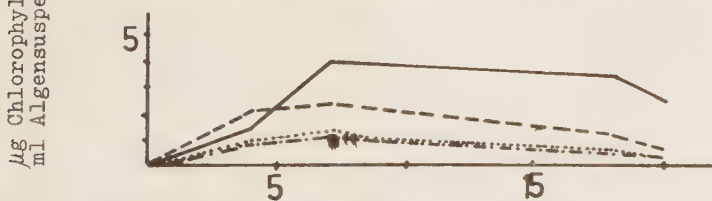


Abb. 11 und 12 zeigen, daß sowohl bei höherer als auch bei niedrigerer Licht-Intensität vor allem im Rotlicht wesentlich mehr Chlorophyll gebildet wurde als im Grün- und Blaulicht. Bei höherer Lichtintensität wurde im Gelblicht etwa so viel Chlorophyll wie im Rotlicht, bei niedriger Lichtintensität jedoch deutlich weniger gebildet.

Tab. 11: Einfluss der Wellenlänge des Lichtes

a) Höhere Lichtintensität (370 Lux)

	Wellenbereich			
	Blau	Grün	Gelb	Rot
Trockengewicht (mg)	28,8	44,4	60,8	63,0
Gesamtlipide (mg)	3,7	5,9	10,3	14,6
Gesamtlipide (% d.Trocken- gewichtes)	12,8	13,5	17,0	23,2
Chlorophylle (μ g/mg Gesamt- lipide)	67,0	175,0	196,0	286,0
Galactosegehalt der Gesamtlipide (μ g/mg Gesamt- lipide)				
MGDG	10,5	>0	33,8	35,3
DGDG	1,8	>0	23,4	22,7
Sulfochinovose	5,5	>0	6,8	7,2
Phosphor (μ g/mg Gesamt- lipid)	2,0	1,5	2,2	2,5

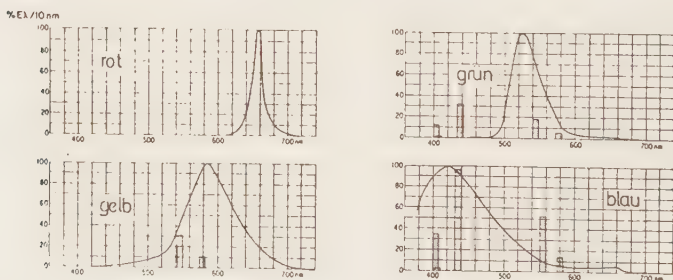
Tab. 12: Einfluß der Wellenlänge des Lichtes

b) Niedrigere Lichtintensität (135 Lux)

	Wellenbereich			
	Blau	Grün	Gelb	Rot
Trockengewicht (mg)	25,9	42,9	47,2	51,2
Gesamtlipide (mg)	3,3	4,3	3,9	8,3
Gesamtlipide (% d.Trocken- gewichtes)	12,9	9,4	8,4	15,7
Chlorophylle (μ g/mg Gesamt- lipide)	34,5	76,1	95,0	151,8
Galactosegehalt der Gesamtlipite (μ g/mg Gesamt- lipide)				
MGDG	0,9	>0	6,8	18,9
DGDG	0,2	>0	2,2	10,8
Sulfochinovose	0,4	>0	1,4	9,0
Phosphor (μ g/mg Gesamt- lipid)	1,0	2,5	1,6	2,2

Die Tabellen 11 und 12 zeigen übereinstimmend, daß bei Züchtung im Licht von unterschiedlicher Wellenlänge zwischen den einzelnen Kulturen deutliche Unterschiede auftraten. Das Wachstum der Zellen (ausgedrückt durch das Trockengewicht) war im Rot- und z. T. im Gelblicht höher als im Grün- und Blaulicht. So war das nach Gefriertrocknung der Algen erhaltene Trockengewicht bei höherer Lichtintensität (s. Tab. 11) im Rot- und Gelblicht (63 mg bzw. 60 mg) deutlich höher als im Grün- und Blaulicht (42,9 mg bzw. 28,8 mg). Das relativ hohe Trockengewicht im Gelblicht mag unter Umständen darauf zurückzuführen sein, daß das verwendete Gelblicht (theoretisch ca.560-630 nm) noch einen größeren Anteil an Rotlicht(ca.630-700 nm) enthielt, wie aus den Emissionsspektren der verwendeten Leuchtstoffröhren s. Abb. 13) hervorgeht.

Abb. 13: Emissionsspektren der verwendeten Leuchtstoffröhren.



(Diese Spektren wurden uns freundlicherweise von der Deutschen Phillips GmbH, München zur Verfügung gestellt.)

Die Untersuchungen zeigen aber deutlich den unterschiedlichen Einfluß von längerwelligem Licht (Rot) und kürzerwelligem Licht (Blau) auf das Algenwachstum. Auch der Einfluß der Lichtintensität auf das Algenwachstum war bei allen Kulturen deutlich. So stiegen die Werte der Trockengewichte im Blaulicht von 25,9 mg bei niedrigerer auf 28,9 mg bei höherer Lichtintensität an. Im Rotlicht erfolgte eine Zunahme von 51,2 mg auf 63,0 mg.

Bei den Gesamtlipiden war ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen längerwelligem und kürzerwelligem Licht zu beobachten: Die Algen bildeten bei Rotlicht größere Mengen an Gesamtlipiden (14,6 mg bei höherer, 8,3 mg bei niedrigerer Lichtintensität) als im Blaulicht (3,7 mg bzw. 3,3 mg). Allgemein wurden bei allen Wellenbereichen bei höherer Lichtintensität mehr Gesamtlipide gebildet.

Auch die Chlorophyllbildung wurde von den hier verwendeten Lichtquellen unterschiedlich beeinflusst: Die Chlorophyllwerte waren bei beiden Lichtintensitäten im Rotlicht höher als die entsprechenden Werte im Gelb- und besonders Grün- und Blaulicht.

Ähnliches gilt für die Galactose- und Sulfochinovose-Bildung: Sie war bei beiden Lichtintensitäten im Rotlicht am größten und im Grün- und Blaulicht vergleichsweise sehr niedrig.

Eine besonders starke Abhängigkeit von dem Wellenbereich und auch von der Lichtintensität zeigte das MGDG. Dieses Lipid hatte je nach Belichtungsbedingungen sehr verschiedene Galactosewerte: Bei der höheren Lichtintensität betrugen sie im Rot- bzw. Blaulicht 35 bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Gesamtlipide. Bei der niedrigen Lichtintensität waren die entsprechenden Werte 19 bzw. 0,9 μg .

Die Phosphorwerte ließen im Gegensatz zu allen übrigen Werten keinen eindeutigen Einfluß der Wellenlänge und der Lichtintensität erkennen.

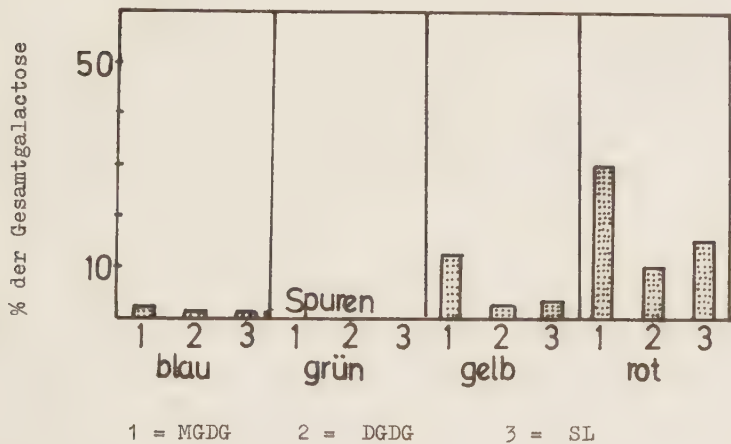
Mit Ausnahme der Phosphorwerte zeigten alle obigen Werte darüberhinaus innerhalb jedes Wellenbereiches ("Farbe") eine Abhängigkeit von der Lichtintensität: Bei der jeweils höheren Lichtintensität waren die Trockengewichte sowie die Chlorophyll-, Gesamtlipid- und Zuckerwerte (Galactose und Sulfochinovose) innerhalb eines Wellenbereiches durchweg höher als bei niedriger Lichtintensität.

Zu beachten ist hierbei noch folgendes: In allen Fällen waren die ermittelten Werte im Rotlicht bei niedriger Lichtintensität immer noch deutlich höher als die entsprechenden Werte im Blau- und Grünlicht bei höherer Lichtintensität. Diese Tatsache zeigt ganz deutlich, daß *Euglena gracilis* für die Bildung der obigen Verbindungen längerwelliges Licht (Rotlicht) benötigt.

Abb. 14: Einfluß von Licht unterschiedlicher Wellenlänge auf die Bildung der Galactolipide. (370 Lux)

blau	grün	gelb	rot	
				Front
				NL
				MGDG
				C
				DGDG
				SL
				PG
				PE
				PI PC
				Start

Abb. 15: Prozentualer Anteil der Glycolipide (MGDG, DGDG und SL) an den Gesamtlipiden bei Be-
lichtung mit Licht unterschiedlicher Wellen-
länge.



Die Abbildung 14 zeigt die Dünnschichtchromatogramme der Gesamtlipide von Serie I. Im Blau-, Grün- und Gelblicht, also vor allem bei kurzwelligem Licht, wurden überwiegend Neutrallipide gebildet (s. Abb. 14 "NL"). Glyco- und Phospholipide waren mit der DC bei diesen Wellenlängen nur in Spuren nachweisbar. Demgegenüber fanden sich im Rotlicht nur geringe Mengen an Neutrallipiden, während hier vor allem die Glycolipide stark überwogen. Dies stimmt mit den in Abb. 15 gezeigten prozentualen Anteilen von MGDG, DGDG und SL an den Gesamtlipiden (berechnet aus den Galactose- und Sulfochinovose-Daten von Tab. 12 überein. Die DC der Gesamtlipide von Serie II (ohne Abb.) lieferte die gleichen Ergebnisse wie die von Serie I.

Tab. 13: Einfluss der Wellenlänge des Lichtes auf die Biosynthese der Fettsäuren.

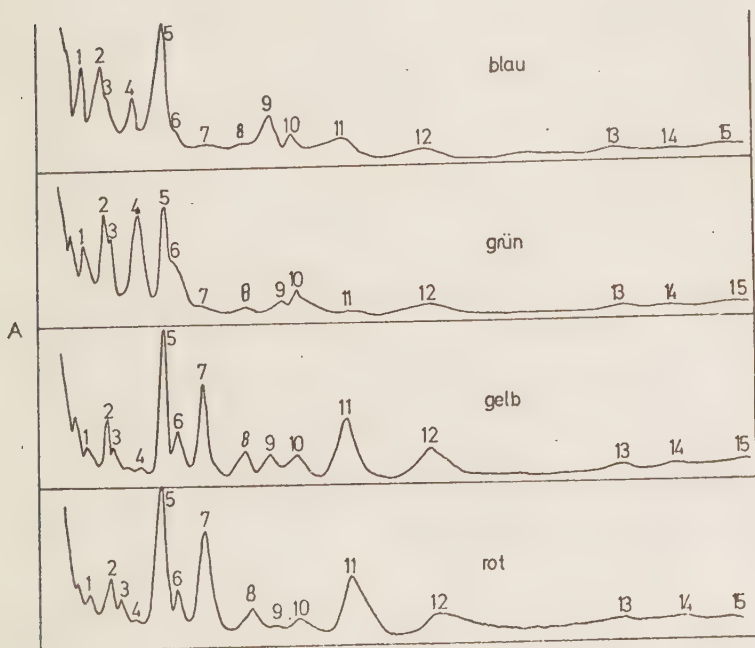
Fettsäuren (% der Gesamt- fettsäuren)	Serie I (370 Lux)				Serie II (135 Lux)			
	Wellenbereich:				Wellenbereich:			
	Blau	Grün	Gelb	Rot	Blau	Grün	Gelb	Rot
12:0	6,6	4,7	2,2	1,3	4,5	6,8	10,3	3,1
14:0	9,2	9,8	4,6	2,0	34,9	14,7	21,7	9,5
14:1	5,9	3,9	5,0	3,1	Sp	0,5	Sp	0,3
15:0	14,7	18,0	1,1	0,3	25,6	20,0	21,5	5,2
16:0	42,8	25,5	20,5	18,1	18,6	18,9	17,2	11,7
16:1	Sp	4,4	7,6	10,0	4,5	8,2	7,6	11,0
16:2	Sp	0,7	15,3	20,3	Sp	Sp	2,1	12,5
16:3	1,7	Sp	4,5	7,3	Sp	Sp	Sp	3,5
16:4	1,8	1,7	2,2	2,3	0,7	0,4	1,8	3,5
18:0	4,2	2,6	1,9	0,8	1,7	2,2	1,6	1,2
18:1	8,3	8,7	5,5	5,1	3,0	7,2	9,6	9,5
18:2	7,1	9,3	10,0	21,7	Sp	2,0	8,4	17,1
18:3	Sp	3,1	12,8	10,0	1,5	3,0	3,5	6,2
18:4	Sp	2,1	1,1	Sp	Sp	Sp	Sp	3,0
20:4	Sp	Sp	2,9	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp
20:5	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp

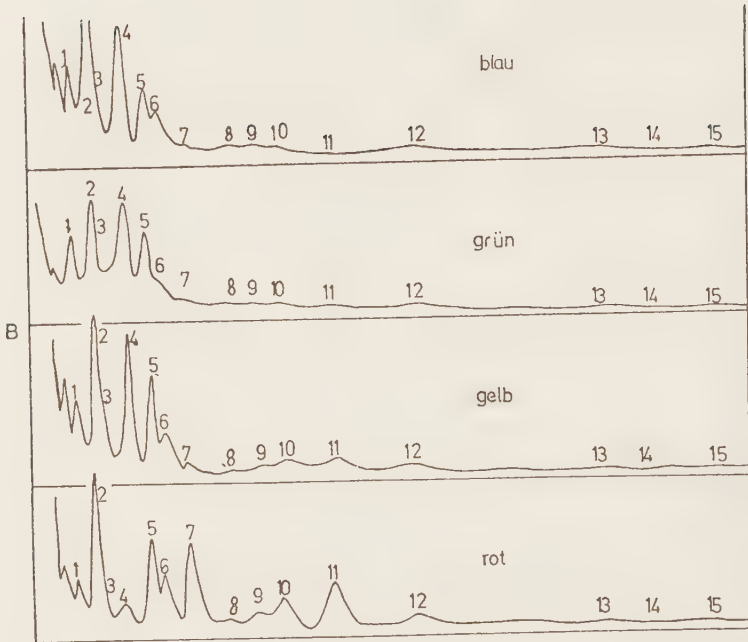
Abb. 16 : GC der Fettsäuremethylester (GC-Säule:Reoplex)

a) bei höherer Lichtintensität (370 Lux)

b) bei niedrigerer Lichtintensität (135 Lux)

1 = 12:0	5 = 16:0	9 = 16:4	12 = 18:3
2 = 14:0	6 = 16:1	18:0	13 = 18:4
3 = 14:1	7 = 16:2	10 = 18:1	14 = 20:4
4 = 15:0	8 = 16:3	11 = 18:2	15 = 20:5





Tab. 13 und Abb. 16 zeigen die Zusammensetzung der Fettsäure-Methylester von *Euglena gracilis* in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichts und von der Lichtintensität. Danach wurden bei kurzwelligem Licht (Blau) und hoher Lichtintensität vor allem gesättigte Fettsäuren (12:0, 14:0, 15:0 und 16:0, zusammen 73,3 %) gebildet. Mit zunehmender Wellenlänge, also vom Blau- zum Rotlicht, nahm der Gehalt an diesen Verbindungen stark ab auf zusammen 21,7 % im Rotlicht.

Demgegenüber erhöhte sich mit zunehmender Wellenlänge der Anteil der höher-ungesättigten Fettsäuren (16:2, 16:3, 16:4, 18:2 und 18:3) von insgesamt etwa 10,6 % im Blaulicht auf 61,6 % im Rotlicht.

Bei der niedrigen Lichtintensität ergab sich das gleiche Bild: Mit zunehmender Wellenlänge Abnahme der gesättigten Fettsäuren von zusammen 83,6 % im Blaulicht auf 29,5 % im Rotlicht sowie Zunahme der höher-ungesättigten C_{16} und C_{18} -Fettsäuren von 2,2% im Blaulicht auf 42,8 % im Rotlicht.

Zusammenfassend läßt sich also bei *Euglena gracilis* über den Einfluß von Licht unterschiedlicher Wellenlänge sagen, daß dieser Organismus für eine Reihe von Stoffwechselprozessen vor allem Rotlicht benötigt. Im Rotlicht wird im Vergleich zu Blaulicht gleicher und sogar höherer Intensität

- a) das Wachstum erhöht,
- b) der prozentuale Gehalt an Gesamtlipiden und Chlorophyllen erhöht,
- c) innerhalb der Gesamtlipiden die Bildung der Glycolipide begünstigt,
- d) innerhalb der Gesamtfettsäuren die Bildung von höher-ungesättigten C_{16} und C_{18} -Fettsäuren begünstigt.

Auf den Gesamtphosphorgehalt konnte kein Einfluß festgestellt werden.

VI. Einfluss von DCMU

(Untersuchungen auf mögliche Zusammenhänge zwischen der Biosynthese von Glycolipiden, höher-ungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren, sowie Chlorophyllen mit der Photosynthese)

Aus den vorangegangenen Kapiteln (IV und V) hatte sich ergeben, daß *Euglena gracilis* Tageslicht bzw. Rotlicht zur Biosynthese von 3 verschiedenen Stoffklassen benötigt. Diese Stoffklassen sind die Chlorophylle, die Glycolipide (SL, MGDG und DGDG) sowie höher-ungesättigte C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren (16:2, 16:3, 16:4, 18:2, 18:3). Frühere Untersuchungen von POHL, NEWMAN und HARRIS (70, 72, 132, 135) hatten bereits gezeigt, daß die Biosynthese dieser Stoffklassen in *Euglena* auch vom Stickstoffgehalt (NH_4^+ , NO_3^-) der Nährlösung abhängt. Sie werden bei höheren N-Konzentrationen (mehr als etwa $400 \mu\text{Mol N/L}$) bevorzugt gebildet. Bei Konzentrationen von weniger als etwa $200\text{--}300 \mu\text{Mol N/L}$ werden hingegen nur geringe Mengen an Chlorophyllen und Glycolipiden sowie überwiegend gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren synthetisiert.

Es ist bekannt, daß die obigen Glycolipide, Fettsäuren und Chlorophylle vorwiegend in den Chloroplasten lokalisiert sind (137 -142). Diese Tatsache und die in den vorangegangenen Kapiteln gezeigte Abhängigkeit vom Tageslicht und dessen Wellenbereichen ließen vermuten, daß die Bildung der erwähnten Stoffklassen mit der Photosynthese in Zusammenhang steht. Bei den Chlorophyllen ist dieser Zusammenhang bekannt, bei den Glycolipiden und ungesättigten C_{16} und C_{18} -Fettsäuren hingegen nicht.

Die nächsten Untersuchungen hatten deshalb zum Ziel, nachzuweisen, ob und wie weit solche Zusammenhänge tatsächlich bestehen. Zu diesem Zweck wurden Züchtungsversuche mit DCMU (3,4-Dichlorphenyl-1,1-dimethylurethan) unternommen, einem Photosynthesehemmstoff (84,100,102,110,113). DCMU wird als Herbizid in der Landwirtschaft zur Vernichtung von Unkräutern eingesetzt. In den Versuchen sollte der Einfluß von unterschiedlichen Konzentrationen von DCMU auf die Biosynthese von Chlorophyllen, Glycolipiden (SL, MGDG und DGDG) und ungesättigten Fettsäuren, sowie auf die Photosyntheserate (Einbau von $^{14}\text{CO}_2$) untersucht werden.

Versuche:

9 Kulturen zu je 500 ml wurden 6 Tage im Dunkeln gezüchtet, dann mit unterschiedlichen Mengen DCMU versetzt und anschließend weitere 6 Tage unter Tageslicht gezüchtet. Die zugegebenen Mengen an DCMU sind in Tab. 14 aufgeführt.

Tab. 14: Zugegebene Mengen DCMU pro Liter

<u>Mol/l:</u>	1.7×10^{-9}	5.2×10^{-9}	1.7×10^{-8}	5.2×10^{-8}
	(0.0004 mg)	(0.0012 mg)	(0.004mg)	(0.012 mg)
<u>Mol/l:</u>	1.7×10^{-7}	5.2×10^{-7}	1.0×10^{-6}	1.7×10^{-6}
	(0.04 mg)	(0.12 mg)	(0.24 mg)	(0.4 mg)
	1.0×10^{-5}			
	(2.4 mg)			

Eine Kultur wurde ohne Zugabe von DCMU als Blindversuch angesetzt. Bei allen Kulturen wurden nach 6 Tagen Belichtung die in Tab. 15 und in den Schemata A-D aufgeführten Werte und die Photosyntheserate bestimmt.

Tab. 15: Einfluss von DCMU auf Trockengewichte, Gesamtlipide, Chlorophyll- und Galactose-
bildung und Photosyntheserate.

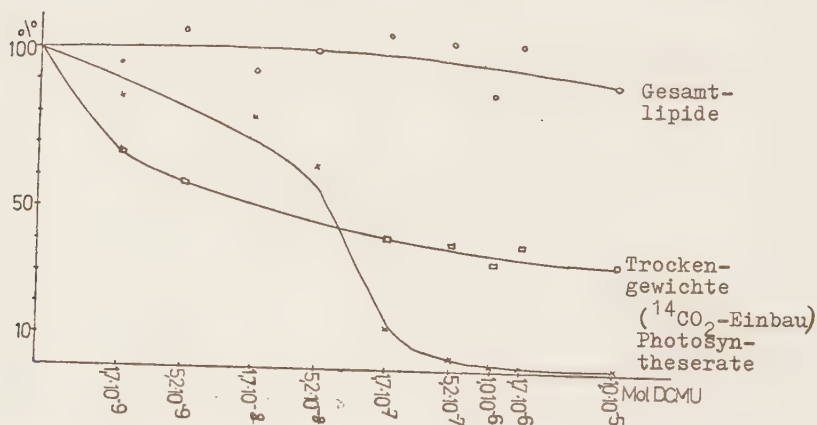
DCMU ($\mu\text{ol/l}$)	ohne DCMU	$1,7 \cdot 10^{-9}$	$5,2 \cdot 10^{-9}$	$1,7 \cdot 10^{-9}$	$1,7 \cdot 10^{-8}$	$5,2 \cdot 10^{-8}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$	$5,2 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
Trocken- gewicht (mg)	187,0	122,5	107,2	133,5	99,6	79,0	72,1	72,1	72,0	64,0	
Trocken- gewicht (% d. Wertes ohne DCMU)	100	66	57	71	53	42	39	33	39	34	
Gesamt- Lipide (mg)	36,0	28,4	29,6	31,5	26,0	26,0	19,0	15,1	19,0	13,0	
Gesamt- Lipide (% d. Trock- engewichtes)	25,7	23,2	27,6	23,8	26,0	27,0	26,4	20,8	26,7	23,0	
Gesamt- lipide (% d. Wertes ohne DCMU)	100	90	107	93	101	105	103	81	104	89	

DCMU ohne (Mol/L) DCMU	1,7·10 ⁻⁹	5,2·10 ⁻⁹	1,7·10 ⁻⁸	5,2·10 ⁻⁸	1,7·10 ⁻⁷	5,2·10 ⁻⁷	1,0·10 ⁻⁶	1,7·10 ⁻⁶	1,0·10 ⁻⁵	
Chloro- phyll (µg/mg Gesamt- lipide	108,8	106,6	86,9	87,1	73,0	48,7	53,1	44,1	29,4	24,1
Chloro- phyll (% d. Wer- tes ohne DCMU)	100	98	79	79	67	44	48	40	26	22
Galac- tosegeh. d. Ges. Lip. (µg/mg Ges. Lip.)	146,3	144,7	140,6	144,9	128,2	108,5	88,4	81,1	74,3	46,1
Galac- tose(% d. Wertes ohne DCMU)	100	98	96	98	89	74	60	55	50	31
Phosphor (µg/mg Ges. Lip.)	14,5	13,4	9,1	10,0	11,0	11,3	7,8	8,4	11,4	9,7
¹⁴ CO ₂ -Ein- bau ^y (dpm)	1843000	1396000	1240000	1481000	1160000	248000	96000	14000	8600	6700
Photo- synthese- rate (% d. Wertes ohne DCMU)	100	76	67	80	63	13	5,2	0,7	0,4	0,3

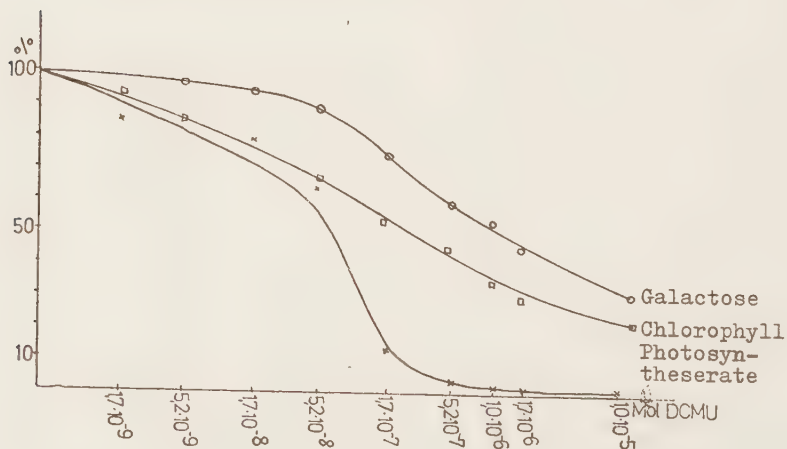
x) ¹⁴C-Blindwert: ohne DCMU und ohne Einbau von ¹⁴CO₂: 720 dpm

x) ¹⁴C-Blindwert: ohne DCMU und ohne Einbau von ¹⁴CO₂: 720 dpm

Schema A: Trockengewichte, prozentualer Gesamtlipidgehalt und Photosyntheserate. (jeweils bezogen auf den Blindwert = 100 %)



Schema B: Chlorophyll- und Galactosebildung und Photosyntheserate (jeweils bezogen auf den Blindwert = 100 %)



Resultate der DCMU-Versuche

1.) Trockengewichte: (s.Tab. 15 und Schema A)

Im Vergleich zum Blindversuch (ohne DCMU) sanken die Trockengewichte mit zunehmender DCMU-Konzentration von 187 mg auf 72 bzw. 64 mg ab, was einer Abnahme von etwa 61 - 66 % entspricht.

2.) Gesamtlipide: (s. Tab. 15 und Schema A)

Die absoluten Gewichtsmengen an Gesamtlipiden verringerten sich bei steigender DCMU-Konzentration gegenüber dem Blindwert (46 mg) etwa im gleichen Verhältnis wie die Trockengewichte auf 13 - 19 mg, entsprechend einer prozentualen Abnahme um 48 - 64 %. Keine eindeutige Änderung war dagegen hinsichtlich des prozentualen Gehaltes an Gesamtlipiden festzustellen. Dieser lag bei allen untersuchten Kulturen, abgesehen von einer Abweichung (20,8 %) zwischen etwa 23 und 27 %, bezogen auf das Trockengewicht.

3.) Chlorophyllbildung: (s.Tab. 15 und Schema B)

Die Chlorophyllwerte verringerten sich bei steigender DCMU-Konzentration bis auf 22 %. Zu beachten ist jedoch, daß bei Zugabe von 0,04 - 0,24 mg DCMU (entsprechend $1,7 \cdot 10^{-7}$ bis $1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol) noch 40 - 50 % des im Blindversuch gebildeten Chlorophylls synthetisiert wurden.

4.) Galactosegehalt der Gesamtlipide ("Lipid-Galactose"): (s. Tab. 15 und Schema B)

Die Galactosewerte, als Maß für den Anteil an Glycolipiden innerhalb der Gesamtlipide, veränderten sich annähernd so wie die Chlorophyllwerte.

Auch hier erreichte die Galactosebildung bei Zugabe von 0,04 - 0,24 mg DCMU ($1,7 \cdot 10^{-7}$ bis $1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol) noch 40 - 50 % des ursprünglichen Wertes (Blindversuch).

5.) Phosphorgehalt:

Die Phosphorwerte zeigten mit zunehmender DCMU-Konzentration eine Abnahme von $14,5 \mu\text{g}$ im Blindversuch auf $9,7 \mu\text{g}$ bei 2,4 mg DCMU.

6.) Photosyntheserate : (s. Tab. 15 und Schema A u. B)

Wie Tab. 15 und Schema A und B zeigen, nahm die Photosyntheserate bei steigenden DCMU-Konzentrationen ($1,7 \cdot 10^{-9}$ bis $5,2 \cdot 10^{-8}$ Mol) zunächst gleichmäßig und langsam ab (von 100 % auf etwa 60 - 70 %), um dann im Bereich zwischen $5,2 \cdot 10^{-8}$ und $1,7 \cdot 10^{-7}$ Mol sehr rasch abzufallen (von ca. 60 % auf 13 % und dann auf 5,3 %). Ab einer Konzentration von $1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol (0,24 mg) betrug die Photosyntheserate weniger als 1 % des Ausgangswertes.

Die Trockengewichte und die prozentualen Gehalte an Gesamtlipiden sind in Schema (A), die Chlorophyll- und Galactosewerte in Schema (B) noch einmal graphisch dargestellt, jeweils unter Hinzufügung der Kurve für die Photosyntheserate.

Diese Kurven zeigen, daß die Photosynthese etwa zwischen 0,04 und 0,24 mg DCMU ($1,7 \cdot 10^{-7}$ und $1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol) bis fast auf Null absinkt. Ab $1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol war praktisch keine Photosynthese mehr feststellbar.

Im Gegensatz zum starken Absinken der Photosyntheserate im angegebenen Bereich war aber bei keiner der anderen Kurven ein ähnlich starkes Absinken festzustellen. So wurden bei praktisch eingestellter Photosynthese ($1.0 \cdot 10^{-6}$ Mol) von Euglena nahezu die gleiche prozentuale Menge an Gesamtlipiden (bezogen auf das Trockengewicht der Algen) und noch etwa 40 % der Trockengewichte, der Chlorophylle und der "Lipid-Galactose" (Gehalt an Glycolipiden innerhalb der Gesamtlipide) gebildet. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion noch eingegangen.

7.) Dünnschichtchromatographie der Gesamtlipide:

(s. Abb. 16)

Als Ergänzung ist in Abb. 16 die DC der Gesamtlipide bei verschiedenen DCMU-Konzentrationen angegeben. Sie ergab, daß bei nur geringer DCMU-Zugabe überwiegend Glycolipide, vor allem MGDG und DGDG, gebildet wurden, während bei hohen DCMU - Konzentrationen ($1,7 \cdot 10^{-6}$ und $1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol) vor allem Neutrallipide (NL) und Phospholipide nachzuweisen waren. Quantitative Aussagen konnten mit der DC nicht gemacht werden (siehe deshalb Galactose und Phosphorwerte.)

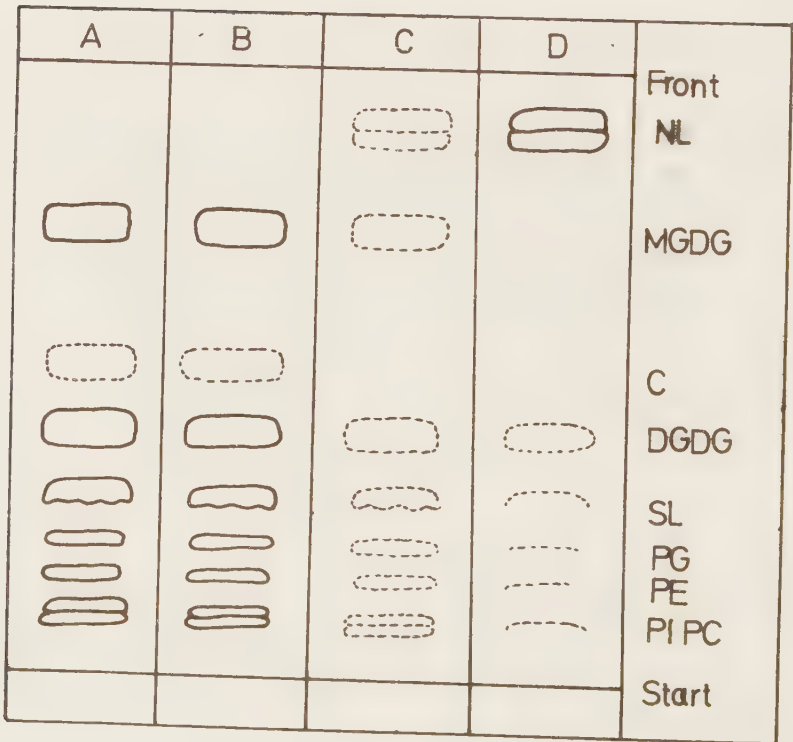
Abb. 16: Dünnschichtchromatographie der Gesamtlipide von *Euglena gracilis*.

A: Züchtung ohne DCMU

B: 0,0004 mg ($1,7 \cdot 10^{-9}$ Mol) DCMU/L

C: 0,04 mg ($1,7 \cdot 10^{-7}$ Mol) DCMU/L

D: 2,4 mg ($1,0 \cdot 10^{-6}$ Mol) DCMU/L

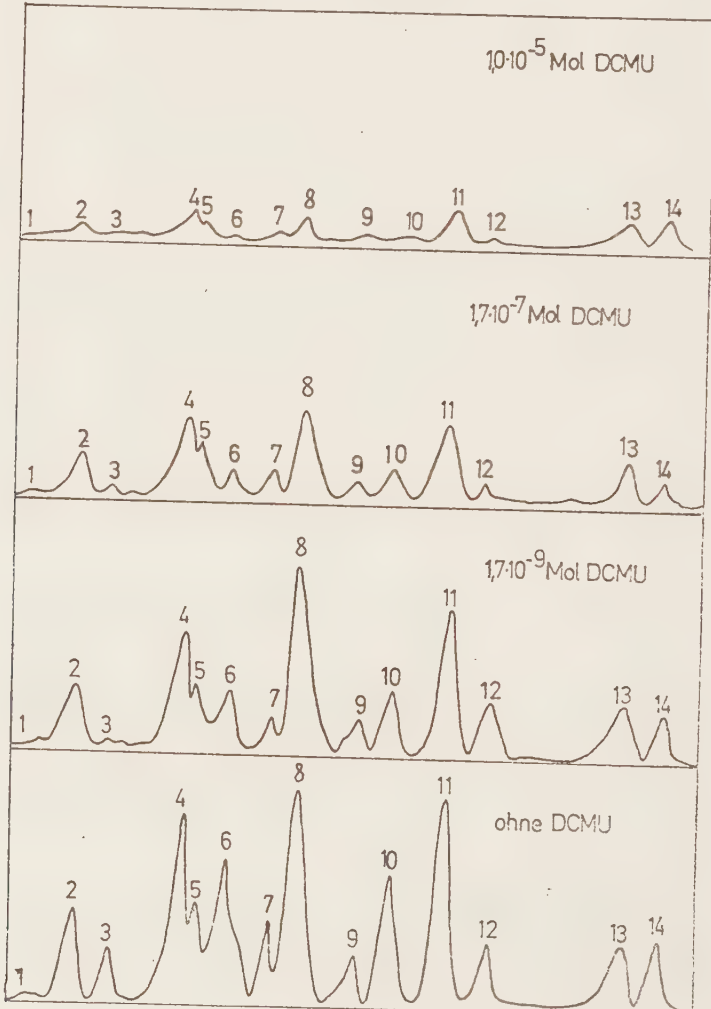


Tab. 17: Einfluß von DCMU auf die Zusammensetzung der Fettsäuren (% der Gesamtfettsäuren)

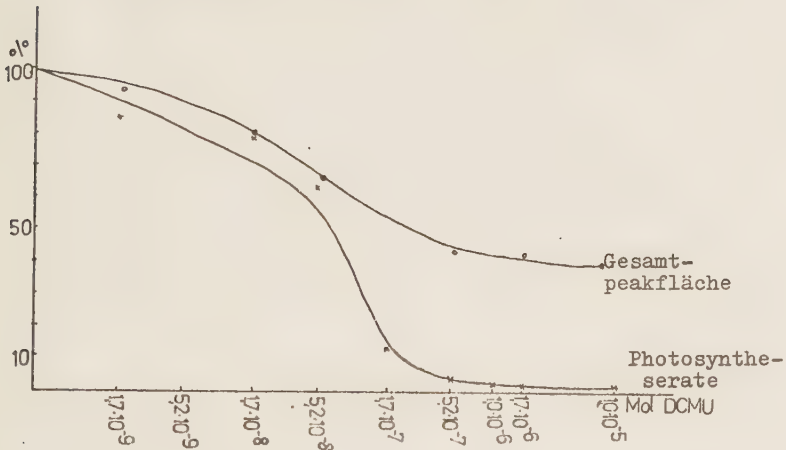
DCMU (Mol)	ohne DCMU	1,7 ·10 ⁻⁹	5,2 ·10 ⁻⁹	1,7 ·10 ⁻⁸	5,2 ·10 ⁻⁸	1,7 ·10 ⁻⁷	5,2 ·10 ⁻⁷	1,0 ·10 ⁻⁶	1,7 ·10 ⁻⁶	1,0 ·10 ⁻⁵
Gesamt- Peak- fläche (% d.w.o. DCMU)	100	96	89	82	67	54	44	43	42	40
Fett- säuren										
12:0	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3	0,1	0,3	0,4	0,2
14:0	4,2	4,0	4,0	4,0	4,2	3,7	3,3	3,6	4,8	4,5
14:1	2,6	0,5	0,4	0,6	0,8	1,8	1,5	1,1	1,0	1,0
16:0	10,0	10,4	8,1	8,0	8,4	9,5	8,9	10,4	12,1	12,4
16:1	6,9	6,5	5,4	5,8	7,0	7,6	7,7	7,0	7,3	7,8
16:2	8,8	8,0	9,8	5,4	8,3	5,0	6,2	2,7	3,0	2,5
16:3	4,7	3,2	3,7	2,8	4,2	5,0	4,0	4,7	3,6	2,9
16:4	16,9	16,5	13,9	13,7	12,2	14,0	11,4	12,2	9,0	7,5
18:0	0,4	0,9	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
18:1	3,4	4,5	4,4	3,3	3,7	3,3	3,7	3,6	3,7	6,3
18:2	9,7	6,6	5,9	4,5	7,6	6,5	5,8	5,2	3,3	2,0
18:3	16,0	18,5	19,9	23,0	17,1	17,0	12,7	12,0	11,2	10,7
18:4	4,8	6,3	6,3	6,9	6,2	4,5	4,0	3,6	3,5	3,0
20:4	7,2	6,3	7,7	7,9	7,4	12,3	12,7	15,4	16,6	15,4
20:5	5,5	5,6	4,9	6,1	5,8	6,4	8,6	9,0	8,3	7,9
unbe- kannte Fettsäuren	2,3	1,8	2,0	2,4	2,6	3,0	5,1	4,2	3,2	8,3

Abb.18: Gaschromatographie der Fettsäuremethylester
GC-Säule: SP 1000) Züchtung bei unterschied-
lichen DCMU-Konzentrationen.

1 = 12:0	5 = 16:1	9 = 18:1	13 = 20:4
2 = 14:0	6 = 16:2	10 = 18:2	14 = 20:5
3 = 14:1	7 = 16:3	11 = 18:3	
4 = 16:0	8 = 16:4	12 = 18:4	

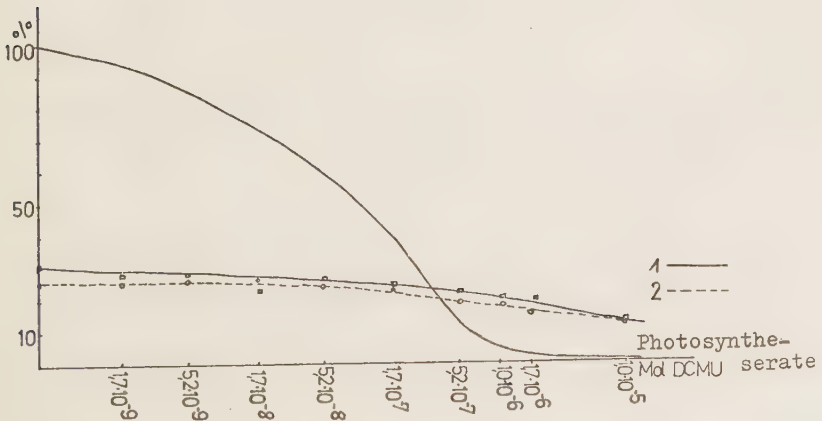


Schema C: Gesamtpeakfläche der Fettsäuren und Photosyntheserate (jeweils bezogen auf den Blindwert = 100%)



Schema D: Ungesättigte Fettsäuren der C_{16} - und C_{18} Reihe und Photosyntheserate (jeweils bezogen auf den Blindwert = 100 %)

- 1.) = 16 : 2 + 16 : 3 + 16 : 4
 2.) = 18 : 2 + 18 : 3



8.) Fettsäuren:

a) Gesamtpeakfläche als Maß für die Gesamtmenge der gebildeten Fettsäuren) (s.Tab. 17 und Schema C)

Wie aus Tab. 17 und Schema C hervorgeht, verminderte sich bei steigenden DCMU-Konzentrationen die Gesamtmenge der Fettsäuren. Diese sank gegenüber der ohne DCMU gezüchteten Kultur (Blindwert 100%) bis auf 40% ab. Bei abgeschalteter Photosynthese ($1,7 \cdot 10^{-6}$ Mol DCMU) wurden noch etwa 45 % der Gesamtfettsäuren gebildet.

b) Zusammensetzung der Fettsäuren

(s. Tab. 17 und Gaschromatogramme der Abb.18)

Tabelle 17 zeigt, daß bei zunehmender DCMU-Konzentration der prozentuale Anteil an gesättigten und einfach-ungesättigten Fettsäuren (14:0, 16:0, 16:1, 18:1) anstieg. Eine deutliche Zunahme war auch bei den mehrfach-ungesättigten Fettsäuren der C₂₀-Reihe festzustellen (20:4 und 20:5).

Der prozentuale Anteil polyungesättigter C₁₆ und C₁₈-Fettsäuren (16:2, 16:3, 16:4, 18:2 und 18:3) nahm dagegen mit steigender DCMU-Konzentration stark ab.

c) Einfluß von DCMU auf die Biosynthese der höher-ungesättigten C₁₆ und C₁₈-Fettsäuren. (s.Tab.17 und Schema D)

Wie aus der Literatur (47,57,69,77,78) bekannt ist und auch im Kapitel IV gezeigt wurde, bildet Euglena gracilis im Tageslicht überwiegend höher-ungesättigte C₁₆ und C₁₈-Fettsäuren(16:2, 16:3, 16:4, 18:2, 18:3).

Um den Einfluß der verschiedenen DCMU-Konzentrationen auf die Bildung dieser ungesättigten Fettsäuren zu verdeutlichen, sind in Schema D die Werte der 16:2-, 16:3- und 16:4 Fettsäuren sowie die der 18:2- und 18:3 - Fettsäuren in 2 Kurven zusammengefaßt und graphisch dargestellt worden. Das Schema zeigt, daß in dem Bereich in dem praktisch keine Photosynthese mehr stattfindet, (ab $1,7 \cdot 10^{-6}$ Mol DCMU) die höher-ungesättigten C_{16} -Fettsäuren noch ca. 25 % und die zwei ungesättigten C_{18} -Fettsäuren noch ca. 20 % der Gesamtfettsäuren ausmachen. Auf Grund der Tatsache, daß die Bildung an Gesamtfettsäuren bei den eingesetzten DCMU-Konzentrationen gegenüber dem Blindwert auf ca. 45 % abgesunken war (siehe Schema C), bedeutet dies, daß bei abgeschalteter Photosynthese noch etwa 11 % der höher-ungesättigten C_{16} -Fettsäure und etwa 10 % der ungesättigten C_{18} -Fettsäuren(18:2 und 18:3) gebildet wurden.

VII. Anhang

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Euglena gracilis*^{x)}

Wie im Kapitel IV gezeigt wurde, bildet *Euglena gracilis* bei abgeschalteter Photosynthese (Zugabe von $1,7 \cdot 10^{-6}$ Mol DCMU pro l) im Vergleich zum Kontrollversuch (ohne DCMU-Zugabe, intakte Photosynthese) noch 40 - 50 % der Chlorophylle, 40 - 50 % der Glycolipide und 10 - 11 % der höher-ungesättigten C_{16} - und C_{18} - Fettsäuren. Diese Verbindungen sind ganz überwiegend Bausteine der Chloroplastenmembranen. Es stellte sich deshalb die Frage, ob *Euglena gracilis* bei abgeschalteter Photosynthese noch Chloroplasten bildet. Diese Frage konnte nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie beantwortet werden.

Mehrere Kulturen wurden deshalb wie im Kapitel VI beschrieben zuerst 6 Tage im Dunkel bis zur stationären Wachstumsphase gezüchtet, dann mit unterschiedlichen Mengen DCMU versetzt und anschließend weitere 6 Tage im Tageslicht gezogen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet.

Hierzu wurden die abzentrifugierten Zellen 90 min bei 4° in 6%-igem Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (pH 7,2) fixiert. Nach wiederholtem Abzentrifugieren wurden die Zellen über Nacht in Phosphatpuffer (pH 7,2) bei 4° gewaschen und dann mit 1% Osmiumtetroxid in Phosphatpuffer für eine Stunde nachfixiert. Nach Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und zweimaliger Behandlung mit Propylenoxid erfolgte die Einbettung des Zentrifugats in Durcupan ACM (FLUKA, Heidelberg). Die Polymerisationszeit betrug 24 Std. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem LKB-Ultratom III mit Glasmessern hergestellt und nach REYNOLDS (154) nachkontrastiert. Die Auswertung erfolgte an einem Siemens Elektronenmikroskop 101.

x)

Da am eigenen Institut kein Elektronenmikroskop zur Verfügung stand, wurden die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit einem anderen Institut durchgeführt: Die Züchtung der Algen erfolgte am eigenen Institut, die für die Elektronenmikroskopie erforderlichen weiteren Arbeiten wurden von Herrn Dr. E. Göbel, Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität, München (Direktor Prof. Dr.J. Boch) durchgeführt.

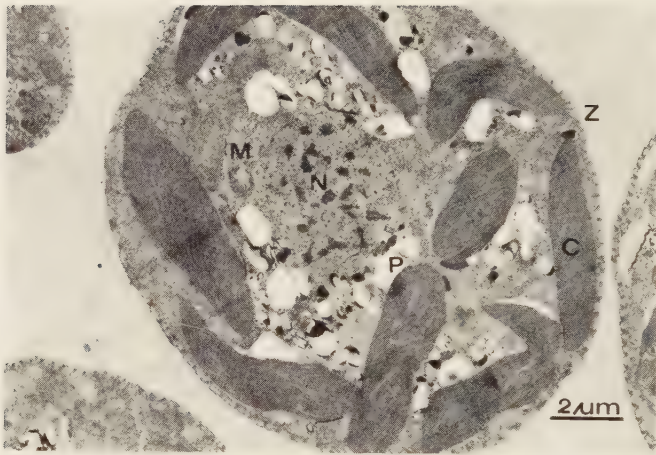


Abb. 19: Ultradünnschnitt von *Euglena gracilis*
(Kontrollversuch: Züchtung ohne DCMU)
(C= Chloroplast; M = Mitochondrium; N = Nucleus;
P = Paramylum; Z = Zellwand)

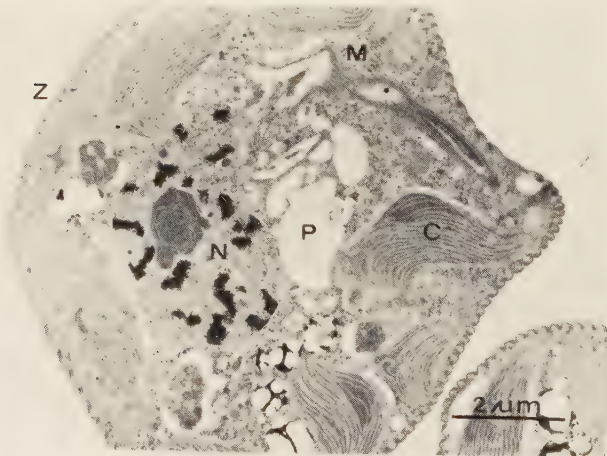


Abb. 20: Ultradünnschnitt von *Euglena gracilis*
(Züchtung bei $1,7 \cdot 10^{-9}$ Mol DCMU/l)

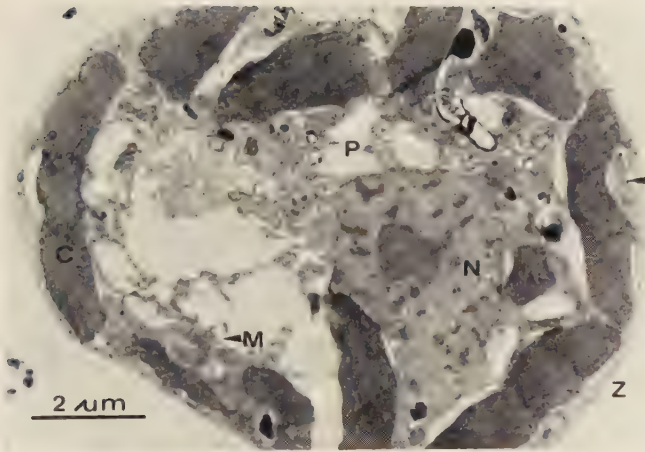


Abb. 21: Ultradünnschnitt von *Euglena gracilis*
(Züchtung bei $1,7 \cdot 10^{-7}$ Mol DCMU/l)

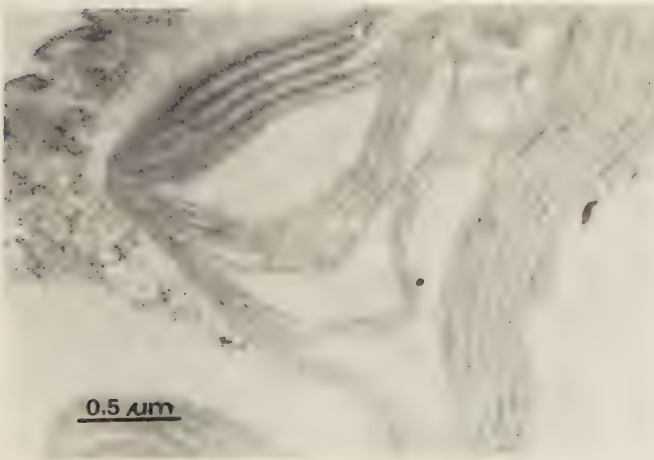


Abb. 22: Ultradünnschnitt von *Euglena gracilis*
(Züchtung bei $1,7 \cdot 10^{-7}$ Mol DCMU/l)

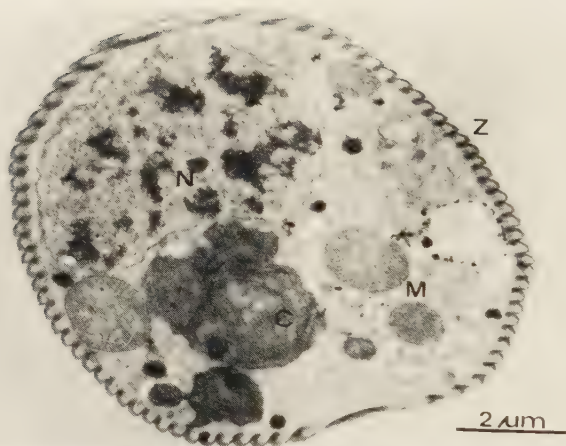


Abb. 23: Ultradünnschnitt von *Euglena gracilis*
(Züchtung bei $1,7 \cdot 10^{-5}$ Mol DCMU/l)

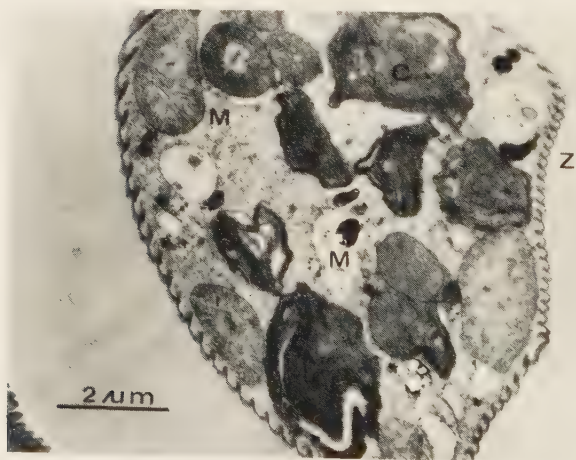


Abb. 24: Ultradünnschnitt von *Euglena gracilis*
(Züchtung bei $1,7 \cdot 10^{-5}$ Mol DCMU/l)

Anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob *Euglena gracilis* unter den oben beschriebenen Bedingungen und bei blockierter Photosynthese noch Chloroplasten bildet.

Abb. 19: In Übereinstimmung mit den Literatur-Angaben BUETOW: *Euglena*, WOLKEN: *Euglena*) bildete *Euglena* bei Züchtung im Tageslicht (Kontrollversuch ohne DCMU-Zugabe; intakte Photosynthese) pro Zelle etwa 8 -12 Chloroplasten, die sich meist entlang der Zellwand orientierten.

Abb.20: Bei Zugabe von $1,7 \cdot 10^{-9}$ Mol DCMU pro Liter war auf Grund der Parallelversuche (s. Kapitel D/VI) die Photosyntheserate von 100% im Kontrollversuch auf etwa 85 % abgesunken. Auch hier bildeten die Zellen etwa die gleiche Zahl von Chloroplasten. Elektronenmikroskopisch waren hinsichtlich der Chloroplasten keine Unterschiede gegenüber dem Kontrollversuch festzustellen.

Abb. 21 und 22: Bei Zugabe von $1,7 \cdot 10^{-7}$ Mol DCMU betrug die Photosyntheserate nur noch etwa 38 % des Kontrollversuches (D/VI). Auch hier bildeten die Zellen Chloroplasten. Jedoch zeigte sich z. T. innerhalb der Chloroplasten eine beginnende Loslösung der parallel gelagerten Thylakoide voneinander und ein Übergang zu einer "knäuel-artigen" Thylakoidanordnung. In der Detailvergrößerung (Abb.22) ist dieser Übergang deutlich sichtbar.

Abb. 23 und 24: Bei Zugabe von $1,7 \cdot 10^{-5}$ Mol DCMU pro Liter führte *Euglena gracilis* keine Photosynthese mehr durch. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen jedoch, daß auch unter diesen Bedingungen noch Chloroplasten gebildet wurden. Abb.23 zeigt einen einzelnen, Abb.24 sechs Chloroplasten in einer Zelle. Die Thylakoide waren vorwiegend parallel zueinander angeordnet, jedoch waren die Chloroplastenmembranen (Abb.24) im Durchschnitt noch stärker knäuel-artig aufgelöst als bei geringeren DCMU-Konzentrationen.

E) Diskussion

Durch die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen sollte ein Beitrag geleistet werden zur Kenntnis der Biosynthese von Fettsäuren und Lipiden in *Euglena gracilis*, unter besonderer Berücksichtigung der Bildung von essentiellen Fettsäuren. *Euglena gracilis* war als Untersuchungsobjekt ausgewählt worden, weil diese einzellige Alge sich im Dunkeln und im Licht züchten läßt und je nach Versuchsbedingungen alle die Untersuchungen notwendigen Fettsäuren und Lipide bildet (s. Kapitel A).

Aus den in den Kapiteln DI/ - D VII beschriebenen Untersuchungen und ihren Ergebnissen lassen sich die folgenden Schlüsse ziehen:

1) Einfluß der Vitamine B1 und B 12

Diese Vitamine haben in den hier verwendeten (niedrigen Konzentrationen keine erkennbaren Einfluß auf die Zusammensetzung der Fettsäuren und Lipide, obwohl *Euglena* diese Vitamine zum Leben benötigt. Demnach scheint also der starke Effekt, den Hefeextrakt-Zusätze zur Nährlösung auf die Fettsäure-Bildung von *Euglena gracilis* und anderen Algen ausübt (Steigerung des Anteils an höher-ungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren)(70) überwiegend oder ganz auf dem hohen Stickstoffgehalt des Hefeextrakts zu beruhen.

2) Einfluß von Sulfat

Der Einfluß unterschiedlicher Sulfat-Konzentrationen war untersucht worden, weil die Bildung des schwefelhaltigen Sulfolipids sich in früheren Versuchen als empfindlich gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren (Licht, N-Gehalt des Nährmediums (57) erwiesen hatte.

Die Untersuchungen zeigen, daß sich die Zusammensetzung der Fettsäuren und Lipide in *Euglena* innerhalb bestimmter Sulfat-Konzentrationen (zwischen 1 und 30 mg Na_2SO_4 pro Liter entsprechend etwa 3 -100 μMol) stark ändert und erst bei noch höheren Konzentrationen konstant bleibt. Niedrige Sulfat-Konzentrationen scheinen die Biosynthese von höher-ungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren (darunter die der essentiellen Fettsäuren) zu behindern, ebenso wie die der Glycolipide (Mono- und Digalactosyldiglycerid und Sulfolipid). Dagegen war kein Einfluß auf die Phospholipide feststellbar. Diese Änderungen gleichen in auffallender Weise denjenigen, die schon früher bei Mangel von Stickstoff (in Form von NH_4^+) (57) bzw. von Mangan (143) bei *Euglena gracilis* beobachtet worden waren: Bei niedrigem N-Gehalt der Nährlösung bzw. Mn-Mangel war ebenfalls der Anteil der höherungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren und der Glycolipide stark zurückgegangen, während der Anteil der Phospholipide konstant geblieben war.

3) Einfluß des Lichts und der Wellenlänge des Lichts

Der hier verwendete Stamm von *Euglena gracilis* zeigte eine starke Abhängigkeit der Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren und Lipiden vom Tageslicht und seiner Intensität und darüberhinaus vom Spektrum des eingestrahltten Lichts: Ebenso wie bei Züchtung unter Tageslicht, wurde auch im Rotlicht die Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren (16:2, 16:3, 16:4, 18:2 und 18:3) sowie den Glycolipiden (MGDG, DGDG und SL) begünstigt, während dies in Gelb- und vor allem in Grün- und Blaulicht nicht der Fall war.

Die Versuche zeigten, daß sogar Rotlicht von niedriger Lichtintensität (etwa 135 Lux) einen weitaus stärkeren Effekt hatte als Grün- und Blaulicht von hoher Lichtintensität (etwa 370 Lux). So zeigte *Euglena* im Rotlicht besseres Wachstum (höhere Trockengewichte) sowie eine stärkere Bildung der erwähnten Fettsäuren und Lipide. Ähnliche Untersuchungen anderer Autoren bestätigen unsere Befunde hinsichtlich des Einflusses von Tageslicht bei *Euglena gracilis* (47,68,69,77,78). Die oben erwähnten ungesättigten Fettsäuren und Lipide sind fast ausschließlich in den Chloroplasten lokalisiert (137-142). Auf Grund der Untersuchungen von BLOCH und Mitarbeitern (144-146) bildet *Euglena gracilis* je nach Versuchsbedingungen (Züchtung im Dunkeln bzw. im Licht) drei verschiedene Fettsäure-Synthetasen. Bei Dunkelzüchtung im Dunkeln werden vor allem gesättigte C_{12} - C_{16} -Fettsäuren synthetisiert, und zwar von einem Multienzymkomplex, der ähnlich wie der von Hefe aufgebaut ist. Bei Züchtung im Licht dagegen bildet sich in *Euglena gracilis* zusätzlich eine Fettsäuresynthetase, die mit den Chloroplasten assoziiert ist und Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C_{12} - C_{18} produziert. NICHOLS (147) konnte zeigen, daß die Bildung einer bestimmten Fettsäure, nämlich der trans3'-6:1 direkt lichtabhängig ist. Diese Verbindung findet sich nur im Phosphatidylglycerin, einem weiteren Chloroplastenlipid, welches ebenso wie MGDG, DGDG und SL vom N-Gehalt der Nährlösung und vom Licht abhängt. (57)

Der oben gezeigte Rotlichteinfluß auf die Biosynthese von Fettsäuren, Lipiden und auch Chlorophyllen bei *Euglena gracilis* führt zu der Frage, welche Photorezeptoren hierfür verantwortlich sind. Wie von verschiedenen Autoren beschrieben wurde, wird in den ersten 24 Std.

Belichtung das im Dunkeln gebildete Protochlorophyll in Chlorophyll umgewandelt, wobei auch Blaulicht stark aktiv ist (91-94). Unsere Versuche zeigten demgegenüber, daß bei längerer Züchtung unter Belichtung (mehr als etwa 5 Tage) Rotlicht einen wesentlich stärkeren Effekt ausübt als Blaulicht.

Hierbei muß beachtet werden, daß eine ursprünglich dunkel gezüchtete *Euglena* bei Belichtung eine grundlegende Umstellung vollzieht: Die im Dunkeln gebildeten Proplastiden werden zu Chloroplasten umgewandelt, Photosynthese-Pigmente (Carotinoide und Chlorophylle) entwickelt und der bisher heterotrophe Stoffwechsel auf Photosynthesebedingungen umgestellt. Die während des Dunkelwachstums synthetisierten Neutrallipide (vor allem Wachsester) werden abgebaut und statt dessen polare Glycolipide aufgebaut, wobei die Wachsester Bausteine (Fettsäuren) für die neugebildeten Glycolipide liefern (71,72). Nach etwa 72 Std. (76) ist *Euglena gracilis* vom heterotrophen Dunkelwachstum an photoauxotrophes Licht-Wachstum adaptiert und weist dann einen vollständig aufgebauten Photosynthese-Apparat sowie eine ganz anders geartete Pigmentzusammensetzung (148,149) auf. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, daß *Euglena* bei Belichtung auch ein neues Photorezeptorensystem entwickelt, welches dafür verantwortlich ist, daß in diesem Organismus bei vollständiger Licht-Adaption die Biosynthese von Fettsäuren, Lipiden und auch von Chlorophyllen überwiegend von Rotlicht angetrieben wird. Nähere Untersuchungen hierüber liegen aber bisher noch nicht vor.

Die obige Abhängigkeit der Biosynthese von höher- ungesättigten C_{16} -Fettsäuren (16:2 - 16:4) vom Rotlicht könnte möglicherweise auch eine weitere Erklärung liefern für die unterschiedlichen Fettsäure-Zusammensetzungen bei marinen Rot-, Braun- und Grünalgen: Die Grünalgen synthetisieren in größeren Mengen die oben erwähnten ungesättigten C_{16} -Fettsäuren. Dagegen finden sich diese Verbindungen nicht oder nur in Spuren bei Rot- und Braunalgen (52). Die Rot- und Braunalgen leben durchschnittlich in größerer Tiefe als die Grünalgen. In diesem Bereich überwiegt der blaue Lichtanteil wegen der stärkeren Absorption des Rotlichts durch das Wasser. Die Rot- und Braunalgen führen deshalb ihre Photosynthese auf Grund ihres Lebensraumes und ihrer Hilfspigmente vorwiegend im Bereich des blauen Anteils des sichtbaren Lichts durch, während die Grünalgen hierzu wegen ihrer Farbstoffe und wegen der geringeren Wassertiefe in etwa gleichem Ausmaß den blauen und roten Lichtanteil benutzen.

Bereits früher war darauf hingewiesen worden, daß die Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren bei verschiedenen Algen vom N-Gehalt des Nährmediums beeinflusst wird und daß die Rot- und Braunalgen unter ungünstigeren (niedrigeren) N-Konzentrationen im Seewasser wachsen als die Grünalgen (70).

4) Einfluß von DVMU

Die vorher beschriebenen Ergebnisse der Licht-Versuche deuteten darauf hin, daß u. U. Zusammenhänge zwischen der Photosynthese und der Biosynthese von bestimmten Fettsäuren (höher-ungesättigte C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren), Glycolipiden und auch Chlorophyllen bestehen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die in Kapitel D/VI beschriebenen Versuche mit dem Photosynthesehemmstoff DCMU unternommen. Diese Versuche ergaben, daß bei geringen DCMU-Konzentrationen (etwa 10^{-9} - 10^{-8} Mol DCMU pro Liter)

zunächst eine etwa gleich starke Hemmung der Photosynthese und der Biosynthese von Chlorophyllen, Fettsäuren und Lipiden eintrat. Ab einer Konzentration von Ca. $5 \cdot 10^{-8}$ Mol DCMU jedoch fiel die Photosyntheserate wesentlich stärker ab als die Bildung der oben genannten Verbindungen. Bei 10^{-6} Mol war die Photosyntheserate praktisch gleich Null. Bei dieser DCMU-Konzentration wurden aber noch 40% der Chlorophylle, 50 % der Glycolipide, 11 % der höher- ungesättigten C_{16} -Fettsäuren (16:2, 16:3 und 16:4) sowie 10 % der höher-ungesättigten C_{18} -Fettsäuren (18:2 und 18:3) synthetisiert. Darüberhinaus zeigten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen (D/VII), daß *Euglena gracilis* trotz abgeschalteter Photosynthese unter Lichteinfluß noch Chloroplasten-Strukturen aufbaute.

Ähnliche Untersuchungen an *Euglena* wurden bisher nur von SCHIFF und seinem Arbeitskreis (100,113,150) veröffentlicht, und zwar im Hinblick auf die Chlorophyll-Bildung. Was diese Farbstoffe betrifft, so stimmen unsere Ergebnisse mit denen von SCHIFF überein, wenngleich wir nicht die von ihm publizierten hohen Chlorophyllwerte bestätigen können. SCHIFF teilte mit, daß bei Blockade der Photosynthese durch 10^{-5} Mol DCMU sogar noch 70 % der Chlorophylle synthetisiert wurden, während bei unseren Versuchen der Wert bei 40 % lag. Abgesehen davon geht aus den hier gezeigten Untersuchungen weiterhin hervor, daß nicht nur ein Teil der Chlorophylle, sondern auch der ungesättigten Fettsäuren und Glycolipide bei blockierter Photosynthese gebildet wurden und daß unter diesen Bedingungen ein Photosyntheseapparat aufgebaut wurde.

Die obigen Versuche zeigen demnach, daß bei Hemmung der Photosynthese nur bis zu einem gewissen Grad auch eine Hemmung der Bildung von bestimmten Fettsäuren, Lipiden, Chlorophyllen und von Chloroplastenstrukturen eintritt. Ein Zusammenhang mit der Photosynthese kann also nur zum Teil bestehen. Dies führt aber zu der Frage, aus welchen Kohlenstoff-Quellen die obigen Verbindungen und Strukturen bei abgeschalteter Photosynthese gebildet werden. Die Zelle muß offensichtlich bei beginnender Belichtung zu ihrem Aufbau eigene Kohlenstoff-Reserven mobilisieren, die außerhalb der sich entwickelnden Chloroplasten liegen.

Nach den Angaben von SCHIFF (150) kommt u. U. das Cytoplasma als Lieferant von Zwischenprodukten für den Aufbau der Chloroplasten in *Euglena gracilis*, var. *bacillaris* in Frage. Nähere Untersuchungen liegen aber bisher nicht vor. Es sind einige Organismen bekannt, die ebenfalls Chlorophylle und Chloroplasten ohne Beteiligung der Photosynthese bilden können: So entwickelt *Chlorella protothecoides* Plastidstrukturen in Gegenwart von Photosynthesehemmstoffen (z.B. CMU)(151). Keimlinge von *Pinus jeffreyi* können im Dunkeln für eine gewisse Zeit Chlorophyll bilden(152). KLEIN (153) berichtete über das Ergrünen und die Entwicklung von Chloroplasten in gebleichten Bohnenblättern bei Abwesenheit der Photosynthese. Demnach scheinen die hier beschriebenen Untersuchungen in Übereinstimmung mit den Berichten anderer Autoren darauf hinzudeuten, daß in *Euglena gracilis* zum Aufbau der Chloroplasten und der in ihnen enthaltenen Fettsäuren und Lipide Baumaterial aus dem übrigen Teil der Zelle geliefert wird.

Die Folgerung hieraus ist, daß zwischen den einzelnen Organellen der Zelle ein Stoff-Austausch vor sich gehen muß, etwa in Form von Transporten oder Transfers von Metaboliten von einem Zellbestandteil zum anderen. Für derartige Austauschvorgänge wurden in den letzten Jahren auch schon einige Hinweise geliefert: So findet zwischen den Mitochondrien und Microsomen verschiedener tierischer und pflanzlicher Organismen ein Austausch von Fettsäuren und von ganzen Phospholipiden statt (155-161). POHL (71,72) berichtete, daß in Euglena-Zellen, die ursprünglich im Dunkeln gezüchtet worden waren, bei Belichtung ein Transfer von Fettsäuren von den im Dunkeln synthetisierten Wachsestern zu den Lipiden der sich neu bildenden Chloroplasten stattzufinden scheint. Nähere Untersuchungen über solche Metaboliten-Transporte innerhalb der Zelle zum Aufbau der Chloroplasten liegen aber bisher nicht vor.

5) Einfluß der verschiedenen Faktoren auf die Bildung von essentiellen Fettsäuren

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, daß in Euglena gracilis und anscheinend auch in anderen pflanzlichen Organismen die Fettsäurebildung sehr anfällig gegenüber einer Reihe von äußeren Einflüssen ist, wie z. B. gegenüber dem Licht, der Lichtintensität, der Wellenlänge des Lichts, dem Sulfatgehalt des Nährmediums und Hemmstoffen. Ähnliche Einflüsse wurden auch bei Mangel an Ammonium-Stickstoff (57) und an Mangan (143) berichtet. Auffallenderweise handelt es sich hierbei bei denjenigen Fettsäuren, die besonders anfällig gegenüber solchen äußeren Einflüssen sind, fast nur um die schon früher erwähnten essentiellen Fettsäuren.

Diese Verbindungen scheinen also bei Verschlechterung der Lebensbedingungen (unzureichende Belichtung, Mineralstoffmangel, Einwirkung von Hemmstoffen, Temperatureinflüsse (unveröffentlicht) in geringeren Mengen synthetisiert bzw. abgebaut zu werden. Möglicherweise dienen die essentiellen Fettsäuren bei pflanzlichen Organismen also als Reservestoffe, die bei Bedarf rasch metabolisiert werden können.

Die oben beschriebene Abhängigkeit der Fettsäure-Bildung von verschiedenen Faktoren läßt die ungesättigten Fettsäuren in Pflanzen möglicherweise als Indikatoren für Umweltsveränderungen geeignet erscheinen. Sie zeigt aber auch, daß die Fettsäuren nur schlecht zur Charakterisierung von Pflanzen herangezogen werden können. Für Zwecke der Chemotaxonomie erscheinen die ungesättigten Fettsäuren also nicht geeignet, weil man in allen Fällen von streng standardisierten Wachstumsbedingungen ausgehen müßte.

6) Zusammenhänge zwischen Fettsäuren und Lipiden

Die Untersuchungen von verschiedenen Autoren (57,68,69, 78) über die Fettsäuren und Lipide von *Chlorella vulgaris* und *Euglena gracilis* deuten darauf hin, daß bei diesen Algen die einzelnen Lipide durch bestimmte Fettsäure-Muster charakterisiert sind. Dieser Befund wird durch die oben gezeigten Ergebnisse erhärtet: Die in dieser Dissertation besonders beachteten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren, welche auf Grund ihrer Strukturen essentielle Fettsäuren sind und sich überwiegend in den Galactolipiden befinden (57,68,69,77,78), wurden durch die verschiedenen Faktoren stets auf die gleiche Weise beeinflusst wie die Galactolipide.

Anscheinend ist die Bindung an diese Lipide in den Chloroplasten wichtig, damit in einfach-ungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren weitere Doppelbindungen eingebaut werden können, was zur Bildung der erwähnten essentiellen Fettsäuren führt. Wie weit hierbei die Art der Belichtung (s. Rotlicht-Einfluß!) und die anderen untersuchten Faktoren direkten Einfluß ausüben, muß durch weitere Untersuchungen erst noch geklärt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

1) Algen:

Die folgenden 6 Stämme von *Euglena gracilis* wurden als bakterienfreie Agar-Kulturen vom Pflanzenphysiologischen Institut, Göttingen, Nikolausberger Weg 18 bezogen.

- 1) *Euglena gracilis* Klebs , leg.S.P. Chu, (Stamm K)
- 2) " " " , leg.Sister Monica Taylor
(Stamm M)
- 3) " " " , var. *Saccharophila*
(Stamm R)
- 4) " " " , leg. T.G.Tomlinson
(Stamm T)
- 5) " " " , leg. De Saedeler
(Stamm Z)

a) Nährmedium:

Euglena gracilis wurde in dem von CRAMER und MYERS (82) beschriebenen organischen Nährmedium (acetat und citrat-haltig) gezüchtet.

Zusammensetzung:

KH_2PO_4 1,0g; K_2HPO_4 1,2g; Na-Citrat 0,8 g;
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g; Na-Acetate 1,0 g; NH_4Cl 0,5 g;
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g; Vit B 1 0,05 mg; Vit B 12 0,0005 mg;
 H_2O dest 1 Liter; Spurenelementlösung 4 ml

Spurenelementlösung

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 600 mg; Na_2EDTA 300 mg;
 H_3BO_3 100 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mg; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mg;
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 30 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3 mg; H_2O 400 ml

b) Züchtung im Tageslicht

Kleinkulturen von *Euglena gracilis* (300 - 500 ml) wurden unter sterilen Bedingungen in Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln bei einer Belichtung von 800-1000 lux im oben erwähnten Nährmedium bakterienfrei gezüchtet. Großkulturen (7 Liter) wurden durch steriles Einleiten von Luft belüftet.

c) Züchtung im Dunkeln

Die Züchtungsbedingungen waren die gleichen wie bei Züchtung im Tageslicht, nur wurden die Flaschen mit Aluminium-Folie umhüllt und die Züchtungen in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

d) Züchtung bei verschiedenen Wellenbereichen des Lichts (in Blau-, Grün-, Gelb- und Rot-Licht)

Die Algenkulturen wurden unter Belichtung mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge wie die Tageslicht-Kulturen (s.o.) gezüchtet. Als Lichtquellen dienten die folgenden Leuchtstoff-Röhren (Fa.Phillips):

Blaulicht: TL 40 W /18

Grünlicht: TL 40 W/17

Gelblicht: TL 40 W/16

Rotlicht : TL 40 W/15

Die Emissionsspektren dieser Leuchtstoffröhren sind in Abb. 13 wiedergegeben.

e) Lichtmessungen

Die Beleuchtungsstärke wurde bei den Züchtungen, die im Tageslicht durchgeführt wurden (Kap D/IV), mit einem UVA-LUX-Beleuchtungsmesser (Fa. Gossen) gemessen.

Bei den Züchtungen der Kulturen in den verschiedenen Wellenbereichen des Lichts (s.Kap. D/V) wurde die Beleuchtungsstärke sowohl mit dem UVA-LUX-Beleuchtungsmesser als auch mit einer Thermosäule (Fa.Kipp und Zonen) in Verbindung mit einem Hewlett-Packard-Voltmeter (419A-DC-Null) bestimmt. Diese Messungen brachten die folgenden Meßwerte:

a) Niedrige Lichtintensität:

UVA-LUX-Beleuchtungsmesser: 135 Lux

Thermosäule: $2,2 \mu\text{W}$ entsprechend $222 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$
(= $0,222 \text{ Watt/m}^2$)

b) Hohe Lichtintensität:

UVA-LUX-Beleuchtungsmesser: 370 Lux

Thermosäule: $6,4 \mu\text{W}$ entsprechend $646 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec}$
(= $0,646 \text{ Watt/m}^2$)

f) Bestimmung des Dunkelwachstums:

Hierzu wurde den Kulturen unter Lichtausschluß steril 1ml entnommen und die Extinktion der Algensuspension gegen Wasser als Blindwert im Eppendorf-Photometer bei 578 nm gemessen.

g) Chlorophyllbestimmung:

Zur Chlorophyllmessung wurde 1 ml der Algensuspension steril entnommen, mit 4ml Methanol p.a. im H₂O-Bad kurz aufgekocht, nach dem Abkühlen auf 5 ml genau ergänzt, abzentrifugiert und im Zeiss-Photometer gemessen.

Chlorophyll a bei 645 nm

Chlorophyll b bei 663 nm

Der Chlorophyllgehalt errechnete sich nach D.J. ARNON (118) als g Chlorophyll / ml Algensuspension.

2. Lipide =====

Lipidextraktion

Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Zellen abzentrifugiert, gefriergetrocknet, gewogen, mit Seesand fein zerrieben und 4 mal 2 Stunden mit je 25 ml Chloroform-Methanol (1:2v/v) unter Stickstoff und ständigem Schütteln bei Raumtemperatur extrahiert. Die Lösung der Gesamtlipide wurde filtriert, unter Stickstoff eingengt und in einem Vakuumexsiccator bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Anschließend wurden die Gesamtlipide in Chloroform-Methanol (1:2 v/v) aufgenommen zu einer Standard-Lipidlösung von genau 10 mg Lipid in 1ml des Lösungsmittels.

Dünnschichtplatten:

Eine Aufschlammung von 4 gr Kieselgel HF₂₅₄ "Merck" in 10 ml H₂O wurde pro Platte (20 x 12 cm) in einer Schichtdicke von 0,25 mm aufgetragen. Die Platten wurden 2 Std. bei 120° C aktiviert und anschließend im Vakuum-Exsiccator über P₂O₅ aufbewahrt.

Auftragen der Gesamtlipide

Pro Platte können 4 mg Gesamtlipide getrennt werden. Die entsprechende Menge (0,4 ml) der Standard-Lipid-lösung (s.o.) wurde mit einem weichen Pinsel strichförmig aufgetragen.

Laufmittel:

Aceton - Benzol - Wasser (91 : 30 : 8) (163)

Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch über eine Destillationskolonne abdestilliert. Die DC-Kammern wurden zur Erlangung einer optimalen Trennung durch Einstellen von Filterpapier gesättigt. Die Laufzeit betrug etwa 30 Minuten.

Nachweis der Lipide:

Nach der Chromatographie wurden die Platten im kalten Luftstrom getrocknet und mit alkalischer 0,003%-iger Lösung von Rhodamin G6 besprüht.

Dieses Reagenz wurde unmittelbar vor dem Besprühen durch Mischen gleicher Volumina wässriger KOH(8%) und wässriger 0,006%-iger Rhodamin G6-Lösung hergestellt.

Die Platten wurden solange besprüht, bis die ganze Schicht gleichmäßig durchfeuchtet war. Dann wurden sie sofort im UV-Licht bei 366 nm betrachtet.

Quantitative Bestimmung der Glycolipide (MGDG, DGDG und SL)

Diese Bestimmungen wurden nach dem von ROUGHAN und BATT (119) angegebenen Verfahren durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 2 mg Gesamtlipide wie oben beschrieben auf DC-Platten aufgetrennt und nach dem Besprühen die bei 366 nm sichtbaren Zonen des MGDG, DGDG und SL mit einer Nadel umrandet und die Zonen mit dem Kieselgelmaterial aus der Platte eluiert. Jeweils 30 - 50 mg des eluierten Materials wurden in ein tarierteres Zentrifugengläschen gegeben und genau gewogen. Zur Bestimmung von MGDG und DGDG wurden dann 1 ml 2%-ige Phenol-Lösung und 4 ml H_2SO_4 conc. zugegeben, zur Bestimmung vom SL 1 ml 5%-ige Phenollösung und ebenfalls 4ml H_2SO_4 conc. Nach gutem Durchmischen am Vortex-Mixer wurde 15 min stehen gelassen und danach 15 min bei 2000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. MGDG und DGDG wurden bei 485 nm, SL bei 480 nm gegen Wasser als Blindwert gemessen. Die Umrechnung der erhaltenen Extinktionswerte auf die entsprechenden Zuckerwerte erfolgte über Eichgeraden mit reiner Galactose.

Gesamtphosphorbestimmung:

Die Bestimmung des Gesamtphosphors erfolgte photometrisch mit Hilfe der Phosphor-Molybdänblau-Färbung (164). Hierzu wurde zunächst durch Veraschen im elektrisch geheizten Aluminiumblock das in den Phosphatiden organisch gebundene Phosphat mineralisiert und mit Perchlorsäure zum Orthophosphat oxydiert, welches mit Ammoniummolybdat einen Komplex bildet. Bei Reduktion des aus dem Orthophosphat und Molybdänsäure gebildeten Komplexes mit Ascorbinsäure tritt eine, der Phosphatkonzentration proportionale Blaufärbung auf.

0,2 mg Gesamtlipide wurden mit 0,5 ml Perchlorsäure im Veraschungsblock zunächst 30 min bei 100°C, dann 90 min bei 180°C verascht. Nach dem Abkühlen wurden 5 ml Entwicklerlösung (s.u.) zugegeben und die Mischung genau 2 Std. bei 37° aufbewahrt.

Die Blaufärbung wird in 2 cm Glasküvetten gegen einen Blindwert bei 772 nm gemessen.

Eine genaue Einwage von 2,0 µg P (als Na_2HPO_3) wurde wie die zu bestimmenden Chargen behandelt und als Bezugswert verwendet.

Lösung I: Perchlorsäure 70 % 50 ml auf 1000 ml H_2O

Lösung II: Ammoniummolybdat in H_2O 2,5 %

Lösung III: Ascorbinsäure in H_2O 10 % (stets frisch zu bereiten)

3. Fettsäuren

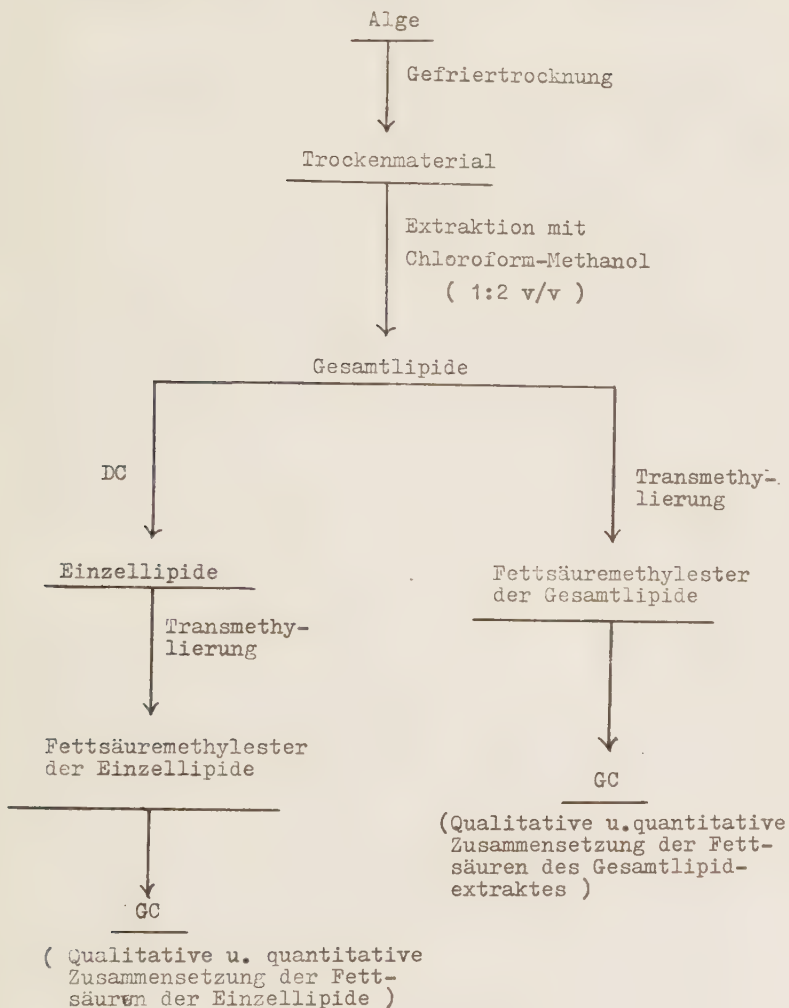
Transmethylierung

Die Transmethylierungen zur Herstellung der Fettsäuremethylester für die Gaschromatographie wurden nach der von POHL, GLASL und WAGNER (163) beschriebenen Methode durchgeführt. Jeweils genau 2 mg der Gesamtlipide wurden in einem Reagenzglas in 2,5 ml Methanol p.a. gelöst, mit 2,5 ml 2 N-Natriummethylatlösung versetzt und dann 20 min stehen gelassen. Dann wurde mit 1 ml HCL (37 %) angesäuert, mit 20 ml Wasser verdünnt und die Mischung nach dem Abkühlen unter Nachspülen mit Wasser in einen 250 ml-Schütteltrichter überführt.

Das Reagenzglas wurde mehrmals mit Wasser nachgespült, bis sich etwa 70 ml Wasser in dem Schütteltrichter befanden. Dann wurde 3 mal mit je 30 ml Petroläther-Äther (1-1) extrahiert. Die vereinigten Oberphasen wurden mit Wasser gewaschen, dann in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt.

Erst unmittelbar vor der GC wurde dieses Lösungsmittel vollständig im N_2 -Strom entfernt und der Rückstand in genau 0.05 ml Chloroform gelöst.

Aufarbeitung des Algenmaterials



Gaschromatographie:

a) Modell Packard

Säule: 3 m x 4 mm

Säulenmaterial: Reoplex 400 (Polyäthylenglykoladipat)
auf Chromosorb WS (45 - 60 mesh)

Temperatur: Säule 195°C

Einlass 215°C

Detektor 215°C

b) Modell Packard

Säule: 2,5 m x 4 mm

Säulenmaterial: EGSS-X (Polyäthylenglykolsuccinat+
Silikon) 15 % auf Gaschrom P (100 - 120 mesh)

Temperatur: Säule 185°C

Einlass 210°C

Detektor 215°C

a. und b.)

Gasdurchfluß: 80 ml Argon / Min

Empfindlichkeit: Schreiber 10^{-7}

Detektor $3 \cdot 10^{-9}$ A bei 650 Volt

Einspritzmenge: 0,2 µl (entsprechend 0,04 mg der
Gesamtlipide)

Papiervorschub: 1 inch / 5 min = Ca. 0,5 cm / min

c) Modell Perkin - Elmer F 20 Fraktometer

Säule: 2,5 m x 2 mm

Säulenmaterial: SP 1000 (Carbowachs mit Phthalsäure)
2,5 % auf Chromosorb G

Temperatur: Säule linear programmiert 180 - 220 °C

Zuwachsrate 2°C/min

Beginn der Programmierung bei Beginn des Luftpeaks

Einlass 210°C

Detektor 215°C

Papiervorschub: 1 inch/ min = 0,25 cm/min

Empfindlichkeit: Bereich 10 Abschwächung 16

Einspritzmenge: 2 µl $\hat{=}$ 0,04 mg Gesamtlipide

4.) $^{14}\text{CO}_2$ -Einbau

Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase im Licht wurden aus jeder Kultur 10 ml steril entnommen. Nach Zugabe von 10 $\mu\text{Ci Na}_2^{14}\text{CO}_3$ wurden die Proben weitere 30 min im Tageslicht belichtet. Dann wurde scharf abzentrifugiert, der Rückstand mit 5 ml methanolischer Ameisensäure (5%) aufgekocht und abermals abzentrifugiert und mit Methanol auf 10,0 ml aufgefüllt. 1,0 ml davon wurden zur Impulsmessung entnommen. Der Niederschlag wurde mit 2 ml Soluene^{x)} vollständig gelöst, mit Methanol auf 5,0 ml aufgefüllt und 1 ml davon zur Impulsmessung verwendet. Zur ^{14}C -Messung wurden die Proben mit etwa 20 ml Toluol-Scintillatorlösung^{xx)} versetzt und gemessen.

Meßgerät: Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 3324

Kanaleinstellung: A: 70-1000; B: 70-200; C: 200-1000

Gain: 7 %

x) Soluene: Packard Soluene 100; Sample Solubilizer

xx) Toluol-Scintillatorlösung: Liquifluor (PPO- POPOP-Toluene Concentrate, New England Nuclear)

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) H.Wagner u. P.Pohl, Phytochemistry 5 , 903 (1966)
- (2) P.Pohl u. H.Wagner, Fette-Seifen-Anstrichmittel 74, 424 (1972)
- (3) P.Pohl u. H.Wagner, Fette-Seifen-Anstrichmittel 74, 541 (1972)
- (4) J.W.Hagemann, K.L.Mikolajczak u. J.A.Wolff, J.Amer. Oil Chemists'Soc. 39, 196 (1962)
- (5) B.Sreenivasan, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 45, 259 (1968)
- (6) G.Jurriens u. A.C.Kroesen, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 42, 9 (1965)
- (7) J.B.Baedle, D.E.Just, R.E.Morgan u. R.A.Reiner, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 42, 90 (1965)
- (8) F.D.Gunstone u. F.B.Padley, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 42, 957 (1965)
- (9) A.M.Gad, M.M.Hasan u. D.E.Munajjed, Planta med. 11, 422 (1963)
- (10) F.R.Earle, C.H.Vanetten, T.F.Clark u. J.A.Wolff, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 45, 867 (1968)
- (11) E.Klenk u. H.Steinbach, Hoppe Seyler's Z.physiol. Chem. 316, 31 (1959)
- (12) W.Stoffel u. E.H.Ahrens, J.Amer.chem.Soc. 80, 6604 (1958)
- (13) E.H.Gruber, R.W.Nelson u. M.E.Stansby, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 41, 662 (1964)
- (14) R.F.N.Hutchins u. M.M.Martin, Lipids 3, 247 (1968)
- (15) R.G.Ackmann u. C.S.Tocher, J.Fisheries Res.Board Canada 25, 1603 (1968)
- (16) K.Hofmann u. F.Tausig, J.biol. Chem. 213, 425 (1965)

- (17) K.Y.Cho u. M.R.J.Salton, Biochim.biophysica Acta 116,73 (1966)
- (18) T.Kaneda, J.biol.Chemistry 238, 1222 (1963)
- (19) T.Kaneda, J.Bacteriol. 93, 894 (1967)
- (20) H.Goldfine u. K.Bloch, J.Biol.Chemistry 236, 2596 (1961)
- (21) G.Scheuerbrandt, H.Goldfine, P.E.Baronowsky u. K.Bloch, J.biol.Chemistry 236,PC 70 (1961)
- (22) G.Scheuerbrandt u. K.Bloch, J.Biol.Chemistry 237, 2064 (1962)
- (23) A.Fulco, R.Levy u.K.Bloch, J.biol.Chemistry 239, 998 (1964)
- (24) K.Bloch, P.Baronowsky, H.Goldfine, W.J.Lennarz, R.Light, A.T.Norris u.G.Scheuerbrandt, Federat. Proc. 20,921 (1961)
- (25) W.J.Lennarz, R.J.Light u. K.Bloch, Proc.nat. Acad.Sci.USA 48, (1962)
- (26) G.Weinbaum u. C.Panos, J.Bacteriol. 92, 1576 (1966)
- (27) A.T.Norris u.K.Bloch, J.biol.Chemistry 238, PC 3133 (1963)
- (28) J.E.Cronan jr., Biochim.biophysica Acta 144, 695 (1967)
- (29) W.M.O'Leary,Biochemistry 4, 1621 (1965)
- (30) V.A.Knivett, J.Cullen u.M.J.Jackson, Biochem. J. 96, 2c (1965)
- (31) R.V.Harris, B.J.B.Wood u. A.T.James, Biochem. J. 94, 22P (1965)
- (32) C.Park u. L.R.Berger, J.Bacteriol. 93,230 (1967)
- (33) B.J.B.Wood, B.W.Nichols u. A.T.James, Biochim. biophysica Acta 106, 261 (1965)
- (34) C.K.Huston u. P.W.Albro, J.Bacteriol. 88, 425 (1964)

- (35) D.G.Bishop u. L.J.Still, J.Lipid Res.4,81 (1963)
- (36) K.Hofmann u. F.Tausig, J.biol. Chemistry 213,
415 (1955)
- (37) J.Cason u. W.T.Miller, J.biol.Chemistry 238,
883 (1963)
- (38) H.Okuyama, T.Kankura u. S.Nojima, J.Biochem.
61,732 (1967)
- (39) A.Ballio, S.Barcellona u. L.Boniforti, J.Bio-
chem. 94, 11c (1965)
- (40) W.Hofheinz u. H.Grisebach, Z.Naturforschung
20b, 43 (1965)
- (41) F.Meyer u. K.Bloch, Biochim biophysica Acta
77, 671 (1963)
- (42) H.Suomalainen u. A.J.A.Keränen, Chem Phys.
Lipids 2, 296 (1969)
- (43) C.Yuan u. K.Bloch, J.biol.Chemistry 236, 1277
(1961)
- (44) J.Erwin u. K.Bloch, Biochem. Z. 338, 496 (1963)
- (45) E.D.Korn, Biochem biophys. Res.Comm. 14,
1 (1964)
- (46) F.A.Mc Elroy u. H.B.Steward, Can. J.Biochem.
45, 171 (1967)
- (47) G.Constantopoulos u. K.Bloch, J.biol.Chemistry
242, 3538 (1967)
- (48) P.Pohl, H.Wagner u. T.Passig, Phytochemistry 7,
1565 (1968)
- (49) E.Klenk, D.Eberhagen u. H.P.Koof, Hoppe-Seyler's
Z.physiol. Chem. 334, 44 (1963)
- (50) R.G.Ackmann, P.M.Jangaard, R.J.Hoyle u. H.Brok-
kerhoff, J.Fisheries Res. Board Canada 21, 747
(1964)
- (51) T.H.Haines, S.Aaronsson, J.L.Gellermann u. H.
Schlenk, Nature(London) 194, 1282 (1962)

- (52) H.Wagner u. P.Pohl, Biochem.Z. 341, 476 (1965)
- (53) H.Brockerhoff, M.Yurkowsky, R.J.Hyle u. R.G. Ackmann, J.Fisheries Res. Board Canada 21, 1379 (1964)
- (54) L.Chuecas u. J.R.Riley, J.Marine Biol.Assoc. United Kingdom 46, 153 (1966)
- (55) H.Schlenk, H.K.Mangold, J.L.Gellermann, W.E. Link, R.A.Morisette, R.T.Holman u. H.Hayer, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 37, 547 (1960)
- (56) P.M.Williams, J.Fisheries Res.Board Canada 22, 1107 (1965)
- (57) P.Pohl u. H.Wagner, Z.Naturforschung 27b, 53 (1972)
- (58) H.Wagner u. H.König, Biochem. Z. 339, 212 (1963)
- (59) H.Wagner u. H.Friedrich, Naturwissenschaften 51, 164 (1964)
- (60) R.Kleiman, F.R.Earle u. I.A.Wolff, J.Amer.Oil Chemists'Soc. 41, 459 (1964)
- (61) R.W.Miller, F.R.Earle u. I.A.Wolff, Lipids 3, 43 (1968)
- (62) R.W.Miller, F.R.Earle u. I.A.Wolff, Amer. Oil Chemists'Soc. 42, 817 (1965)
- (63) T.K.Miwa u. I.A.Wolff, J.Amer. Oil Chemists'Soc. 40, 742 (1963)
- (64) H.Wagner u. h. Friedrich, Biochem. Z. 57, 305 (1965)
- (65) H.Schlenk u. J.L.Gellermann, J.Amer. Oil Chemists'Soc. 42, 504 (1965)
- (66) A.Radunz, Phytochemistry 6, 399 (1967)
- (67) D.Hulanicka, J.Erwin u. K.Bloch, J.biol.Chemistry 239, 2778 (1964)
- (68) B.W.Nichols, Biochim.biophysica Acta 106, 274 (1965)

- (69) A.Rosenberg u. J.Gouaux, J.Lipid Res. 8, 80 (1967)
- (70) P.Pohl, T.Passig u. H.Wagner, Phytochemistry 10, 1505 (1971)
- (71) P.Pohl, Z.Naturforsch. 28c, 264 (1973)
- (72) P.Pohl, Z.Naturforsch. 28c, 270 (1973)
- (73) D.E.Buetow, The Biology of Euglena, Academic Press, New York (1968)
- (74) J.J.Wolken, Euglena, Appleton-Century-Crofts(1967)
- (75) M.E.Boutin u. R.M.Klein, Plant Physiol. 49, 656 (1972)
- (76) A.W.Holowinsky u. J.A.Schiff, Plant Physiol. 45, 339 (1970)
- (77) A.Rosenberg u. M.Pecker, Biochemistry 3, 254 (1964)
- (78) A.Rosenberg, J.Gouaux u. P.Milch, J.Lipid Res. 7, 733 (1966)
- (79) J.Nagai u. K.Bloch, J.biol. Chemistry 242, 357 (1967)
- (80) B.W.Nichols u. R.S.Appleby, Phytochemistry 8, 1907 (1969)
- (81) H.Glasl u. P.Pohl, Z.Naturforsch. 29c, 399(1974)
- (82) M.Cramer u. J.Myers, Arch. Microbiol. 17, 384 (1952)
- (83) J.R.Cook, J.Gen.Microbiol. 75, 51 (1973)
- (84) S.C.Holt u. A.I.Stern, Plant Physiol. 45, 475 (1970)
- (85) H.T.Epstein u. J.A.Schiff, J.Protozool. 8, 427 (1961)
- (86) L.Ebringer, Natuwissenschaften 49, 334 (1962)
- (87) D.G.Bishop u. R.M.Smillie, Arch. Biochem. Biophys. 139, 179 (1970)
- (88) J.L.Mego u. D.E.Buetow, J.Protozool.13, 20 (1966)

- (89) J.A.Schiff u. H.T.Epstein, The Biology of Euglena, ed. D.E.Buetow, Academic Press, New York, Vol.2 (p.285) (1968)
- (90) A.Michaels u. A.Gibor, J.Cell Science 13, 799 (1973)
- (91) J.M.Egan u. J.A.Schiff, Plant Science Letters 3, 101 (1974)
- (92) J.J.Wolken u. A.D.Mellon, J.Gen Physiol. 39, 675 (1956)
- (93) J.J.Wolken, A.D.Mellon u. C.L.Greenblatt, J. Protozool. 2, 89 (1955)
- (94) M.Nishimura u. H.Huzisige, J.Biochem 46, 225 (1959)
- (95) A.Sheneyuor, Y.Ben-Shaul u. M.Avron, Exptl.Cell Res. 58, 1 (1969)
- (96) L.Provasoly, S.H.Sutner u. A.Schatz, Proc.Soc. Exptl.Biol.Med. 69, 279 (1948)
- (97) J.T.O'Kirk, Biochim.biophysica Acta 56, 139 (1962)
- (98) J.T.O.Kirk, Biochim.biophysica Acta 59, 476 (1962)
- (99) J.g!Bovarnick, S.W.Chang, J.A.Schiff u. S.D. Schwarzbach, J.Gen Microbiol. 83, 51 (1974)
- (100) J.A.Schiff, M.H.Zeldin u. J.Rubman, Plant Physiol. 42, 1716 (1967)
- (101) M.H.Zeldin u. J.A.Schiff, Plant Physiol. 42, 922 (1967)
- (102) A.L.Etienne, Biochim biophysica Acta, 333, 320 (1974)
- (103) J.T.O.Kirk u.R.L.Allen, Biochem.biophy.Res.Comm. 21, 523 (1965)
- (104) J.R.O.Kirk, Nature 226, 182 (1970)
- (105) J.T.O.Kirk, Plants 78, 200 (1968)
- (106) K.A. Siegesmund, W.G.Rosen u.S.R.Gawlik, Amer.J. Bot. 49, 137 (1962)
- (107) G. Brawerman u.E. Chargaff, Biochim.biophys. Acta 37, 221 (1960)

- (108) E.G.Pringsheim u. O.Pringsheim, New Phytologist 51, 65 (1951)
- (109) A.Uzzo u. H.Lymann, Biochim.biophysica Acta 180, 573 (1969)
- (110) M.R.Dwyer u. R.M.Smillie, Biochim.biophysica Acta 216, 392 (1970)
- (111) D.Drown u. R.A.Galloway, Arch.Mikrobiol. 68, 377 (1969)
- (112) Y.Ben-Shaul u.I.Ophir, Planta 91, 195 (1970)
- (113) J.A.Schiff u. M.H.Zeldin, J.Cell.Physiol. 72, (Suppl.1), 103 (1968)
- (114) A.Gibor, J.Protozool.16, 190 (1969)
- (115) H.Lymann, H.T.Epstein u. J.A.Schiff, Biochim. biophysica Acta 50, 301 (1961)
- (116) D.R.Mc Calla u. W.Baerg, J.Protozool.16,425(1969)
- (117) T.E.Round,The Biology of Euglena, ed.E.Arnold, London (1965)
- (118) D.J.Arnon, Plant Physiol. 24, (1949)
- (119) P.G.Roughan u.R.D.Batt,Analyt.Biochem. 22, 74 (1968)
- (120) E.F.Carell, J.Cell Biol. 41, 2,431 (1969)
- (121) M.R.Droop, Physiology and Biochemistry of Algae, ed.Ralph a. Lewin, Academic Press, London, 141 (1962)
- (122) J.R.Cook,The Biology of Euglena, Vol 1, ed. D.E.Buetow,Academic Press, London 244 (1968)
- (123) D.E.Buetow, J.of Cell and Comparative Physiology 66, 2 (1965)
- (124) A.Rosenberg, M.Pecker u. E.Moschides, Biochem. 4,680 (1965)
- (125) A.Rosenberg, Biochemistry 2, 1148 (1963)
- (126) A.Rosenberg, Science 157, 1189 (1967)

- (127) F.N.Helmy, M.H.Hack u. P.G.Yaeger, Comp.Biochem. Physiol. 23, 565 (1967)
- (128) C.R.Reitz, Biochim.biophysica Acta 260, 654 (1972)
- (129) J.Nagai, T.Chata u. E.Santo, Biochim.biophysica Acta 42, 523 (1971)
- (130) S.B.Chang u. N.D.Kulkarny, Phytochemistry 9, 927 (1970)
- (131) J.E.M.Ballantine u. B.J.Forde, Amer.J.Bot. 57, 10 (1970)
- (132) D.W.Newman, Plant Physiol. 41, 328 (1966)
- (133) V.M.Kosky, C.S.French u. I.H.Smith, Biochim. biophysica Acta 31, 1 (1951)
- (134) H.I.Virgin, Physiologia Plantarum 11, 347 (1958)
- (135) R.C.Harris u. J.T.O.Kirk, J.Biochem.113, 195 (1969)
- (136) J.R.Cook, Biophys.J. 12, 1467 (1972)
- (137) C.F.Allen, P.Good, H.F.Davies, P.Chisum u. S.D.Fowler, Amer. Chem.Soc. 43, 223 (1966)
- (138) A.A.Benson, Natl.Res.Council Publ.N.1145(1963)
- (139) A.A.Benson, J.Amer.Chem.Soc.43, 265 (1966)
- (140) T.Weier u. A.A.Benson, Amer.J.Bot.54, 389(1967)
- (141) B.W.Nichols, Lipids 3, 354 (1968)
- (142) F.Koenig, Z.Naturforsch. 26b, 1180 (1971)
- (143) G.Constantopoulos, Plant Physiol. 45, 76(1970)
- (144) J.Délo, M.L.Ernst-Fonberg u. K.Bloch, Arch. Biochem.Boiphys. 143, 384 (1971)
- (145) M.L.Ernst-Fonberg u. K.Bloch, Arch.Biochem. Biophys. 143, 392 (1971)
- (146) I.Goldberg u. K.Bloch, J.Biol.Chemistry 247, 7349 (1972)
- (147) B.W.Nichols, P.Harris u. A.T.James, Biochem. biophys.Res.Commune 21, 473 (1965)
- (148) T.W.Goodwin u. M.Jamikorn, J.Protozool.4, 216 (1954)

- (149) C.L.Greenblatt u. J.A.Schiff, J.Protozool. 6, 23 (1959)
- (150) J.A.Schiff, Stadler Symposia 3, 89 (1971)
- (151) M.Matusuka u. E.Hase, Plant Cell. Physiol. 7, 149 (1966)
- (152) L.Bogorad, Bot Gaz. 111, 221 (1950)
- (153) S.Klein u. J.Neuman, Plant Cell. Physiol. 7, 115 (1966)
- (154) E.S.Reynolds, J.Cell Biol. 17, 208 (1963)
- (155) M.Akiyama u. T.Sakagami, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 187, 105 (1969)
- (156) P.Mazliak u. A.B.Abdelkader, Phytochemistry 10, 2879 (1971)
- (157) S.B.Shohet, J.Lipid Res. 12, (1971)
- (158) A.B.Abdelkader u. P.Mazliak, Eur.J.Biochem. 15, 250 (1970)
- (159) K.W.A.Wirtz u. D.B.Zilversmit, Biochim.biophys. Acta (Amsterdam) 193, 105 (1969)
- (160) F.B.Junggalawa u. R.M.C.Dawson, Biochem. J. 117, 481 (1970)
- (161) K.W.A.Wirtz, L.M.G.van Golde u.L.L.M.van Deenen, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 218, 176 (1970)
- (162) D.B.Zilversmit, J.Lipid Res. 12, 36 (1971)
- (163) P.Pohl, H.Glasl u. H.Wagner, J.Chrom. 49, 488 (1970)
- (164) H.P.Franck, J.Hölzl u. H.Wagner, Z.Naturforsch. 23b, 439 (1968)

LEBENS LAUF

Am 28.3.1941 wurde ich , Ruth Riessner-Schoeller in Frankfurt/Main geboren. Meine Eltern sind der Kunstmaler Rudolf Schoeller und seine Ehefrau Maria Schoeller.

Besuch der Volksschule in Mönchberg/Spessart sowie der Oberrealschulen in Aschaffenburg , Weilheim/Obb. und Kylemore in Irland. Abschluss der höheren Schule 1962 durch das School-Leaving-Certification an der Kylemore- Abbey-School, Kylmore , Irland.

Matriculation 1962 an der Universität von Galway, Irland. Ergänzungsprüfung für deutsche Inhaber ausländischer Reifezeugnisse 1962 am Klenze-Gymnasium in München.

Von 1963 - 1965 Praktikantenzeit in der Elisabeth - Apotheke in München. 1966 - 1970 Studium der Pharmazie am Pharmazeutischen Institut der Universität München. 1970 Staatsexamen an der Universität München.

1971 Beginn der Promotion am Institut für Arzneimittellehre in München zunächst unter Leitung von Herrn Prof. Dr.Wagner, dann von Herrn Prof. Dr.Pohl. Im Juni 1975 Verheiratung mit dem Diplom-Kaufmann Gerhard Riessner.

